

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
À
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN VIROLOGIE

PAR
MICHELINE LETARTE

ÉTUDE DE LA VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE DE LA TRANSCRIPTASE
INVERSE DU VIH-1 CHEZ DES PATIENTS SÉROPOSITIFS SOUS
TRAITEMENT À L'AZIDOTHYIMIDINE (AZT)

AOUT 1993



TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
SOMMAIRE.....	xi
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1 SYNDROME DE L'IMMUNODÉFICIENCE ACQUISE.....	4
2 VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE.....	6
2.1 Historique.....	6
2.2 Classification.....	6
2.3 Structure.....	7
2.3.1 Morphologie du VIH.....	7
2.3.2 Génome et protéines virales.....	10
2.4 La transcriptase inverse.....	19
3 THÉRAPEUTIQUE.....	24
3.1 Stratégies antivirales.....	24
3.2 Zidovudine.....	25
3.2.1 Activité antivirale.....	25
3.2.2 Mécanisme d'action.....	29

3.2.3 Effets secondaires.....	30
3.2.4 Résistance.....	30
3.3 Autres inhibiteurs de la transcriptase inverse.....	31
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	33
1 ÉCHANTILLONS.....	34
1.1 Échantillons cliniques.....	34
1.2 Échantillons témoins.....	35
2 RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (RPC).....	36
3 TRANSFERT DE TYPE «SOUTHERN».....	43
4 PRÉPARATION DES SONDÉS.....	43
5 HYBRIDATION.....	48
5.1 Hybridation avec sondes oligonucléotidiques.....	48
5.2 Déshybridation des membranes.....	48
6 CLONAGE.....	49
6.1 Purification des ADN amplifiés.....	49
6.2 Ligation et transformation.....	49
7 DÉTECTION DES COLONIES RECOMBINANTES.....	53
7.1 Transfert des colonies sur filtre.....	53
7.2 Hybridation des colonies sur filtre.....	53
7.3 Minipréparation des colonies positives à l'hybridation.....	54
7.4 Digestion par endonucléase de restriction.....	54

8 SÉQUENÇAGE.....	55
8.1 Purification des plasmides recombinants.....	55
8.2 Réaction de séquençage.....	55
8.3 Analyse des séquences.....	56
RÉSULTATS.....	57
1 AMPLIFICATION DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES.....	58
2 HYBRIDATION.....	58
2.1 Dans une région conservée du gène <i>pol</i> (sonde RTC-1).....	58
2.2 Dans une région variable du gène <i>pol</i> (sonde SC67/70).....	59
2.3 Dans une région variable du gène <i>pol</i> (sonde SC215/219).....	60
3 CLONAGE.....	60
4 SÉQUENÇAGE.....	61
DISCUSSION.....	80
CONCLUSION.....	87
BIBLIOGRAPHIE.....	89

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1	Compilation des données se rapportant aux échantillons cliniques.....	63
Tableau 2	Comparaison des substitutions des acides aminés retrouvés dans le fragment amplifié de la RT du VIH-1, provenant du patient 024 sous traitement à l'AZT avec une souche de référence (HIVBRU).....	78
Tableau 3	Comparaison des substitutions des acides aminés retrouvés dans le fragment amplifié de la RT du VIH-1, provenant du patient 025 sous traitement à l'AZT avec une souche de référence (HIVBRU).....	79
Tableau 4	Comparaison des substitutions des acides aminés retrouvés dans le fragment amplifié de la RT du VIH-1, provenant du patient 320 sous traitement à l'AZT avec une souche de référence (HIVBRU).....	79
Figure 1	Représentation schématique du VIH-1 avec ses principales composantes (tirée d'Arnold et Arnold, 1991).....	8
Figure 2	Représentation schématique de l'organisation génomique du VIH-1 (tirée d'Arnold et Arnold, 1991).....	11
Figure 3	Structure de la RT avec ses deux domaines catalytiques (d'après Larder <i>et al.</i> , 1987).....	22
Figure 4	Structures moléculaires du 3'-azido-3'-déoxythymidine et de la thymidine.....	27
Figure 5	Amorces utilisées pour la réaction de polymérisation en chaîne (RPC).....	38

Figure 6	Représentation schématique du fragment de 820 pb de la RT du VIH-1 avec les quatre amorces.....	40
Figure 7	Représentation schématique du fragment de 629 pb dans la RT avec les trois sondes oligonucléotidiques employées pour la technique d'hybridation.....	46
Figure 8	Vecteur de clonage pCR1000 avec les sites de restriction de <i>Not</i> 1.....	51
Figure 9	Visualisation après électrophorèse en gel d'agarose 0,8% des fragments d'ADN de 629 pb obtenus après amplification.....	64
Figure 10	Visualisation après électrophorèse en gel d'agarose 0,8% des fragments d'ADN de 629 pb obtenus après amplification.....	66
Figure 11	Autoradiographies obtenues après hybridation avec différentes sondes.....	68
Figure 12	Autoradiographies obtenues après hybridation avec différentes sondes.....	70
Figure 13	Excision des insertions de 974 pb par <i>Not</i> 1 de quelques clones recombinants de la série des produits amplifiés provenant des échantillons 024.....	72
Figure 14	Comparaison des séquences des fragments d'ADN amplifiés provenant du patient 024 à différents temps de traitement à l'AZT avec la séquence de la souche HIVBRU utilisée comme référence.....	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
Arg	arginine
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ARV	“AIDS-associated retrovirus”
Asn	asparagine
Asp	acide aspartique
AZT	3'-azido-3'-déoxythimidine
BLV	“Bovine Leukemia Virus”
CA	capside
CRS	“cis-acting repressing sequence”
DDC	2',3'-didéoxycytidine
DDI	2',3'-didéoxyinosine
<i>Env</i>	enveloppe
<i>Gag</i>	“group-specific antigen”
gp	glycoprotéine
Gln	glutamine
HIV	“human immunodeficiency virus”

HSV	“Herpes simplex virus”
HTLV	“human T-cell lymphotropic virus”
Ile	isoleucine
IN	intégrase
Kb	kilobase
KDa	kilodalton
LAV	“lymphadenopathy-associated virus”
Leu	leucine
LTR	“long terminal repeat”
Lys	lysine
MA	matrice
Met	méthionine
μCi	micro Curie
NC	nucléocapside
<i>Nef</i>	“negative regulator factor”
NRE	“negative regulatory element”
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
Phe	phénylalanine
<i>Pol</i>	polymérase
PR	protéase
<i>Rev</i>	“regulator of virion-protein expression”
RNase H	ribonucléase H

RRE	“ <i>rev</i> responsive element”
RT	transcriptase inverse
SIDA	syndrome de l'immunodéficience acquise
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SU	surface
TAR	“trans-activation responsive region”
<i>Tat</i>	“trans-activating transcriptional regulator”
Thr	thréonine
TM	transmembranaire
Tyr	tyrosine
Val	valine
<i>Vif</i>	“virion infectivity factor”
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
<i>Vpr</i>	“viral protein R”
<i>Vpu</i>	“viral protein U”

SOMMAIRE

L'utilisation de l'AZT chez des personnes atteintes du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est compliquée par l'émergence, en cours de traitement, de populations de virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) résistantes à cette substance antivirale. L'AZT agit au niveau de la synthèse de l'ADN proviral par la transcriptase inverse, bloquant ainsi une des étapes dans la réplication du virus. Certaines mutations retrouvées sur le génome du VIH-1, dans le gène *pol*, semblent être associées à la résistance à l'AZT. Le but de ce travail était d'établir s'il y a apparition de mutations dans le gène *pol* d'isolats de VIH-1 présents chez des patients séropositifs sous traitement à l'AZT.

L'approche expérimentale comportait l'isolement des cellules mononucléées de 24 patients séropositifs et l'extraction de l'ADN génomique par lyse cellulaire. Des amorces spécifiques ont été utilisées pour amplifier un fragment de 629 paires de base, correspondant à une portion du gène *pol*. Ce fragment amplifié a été transféré sur une membrane de nylon et hybridé avec les oligonucléotides, SC67/70 et SC215/219, permettant ainsi de déterminer la présence de mutations dans la région amplifiée. Une variation du signal d'hybridation de la sonde SC67/70 avec les échantillons provenant du patient 024 a effectivement permis l'identification de mutations suite au traitement par l'AZT. D'autres échantillons tels que le 063-5 108-4 et le 348 ont montré une absence de signal d'hybridation pour la même sonde.

Les fragments amplifiés des échantillons à l'étude ont été clonés et leur séquence nucléotidique déterminée. L'analyse de ces séquences a mis en évidence, chez les patients 024 et 320, la substitution d'une population de virus de type sauvage par une population virale démontrant la présence de mutations associées à la résistance à l'AZT; certaines de ces mutations étant transitoires. Ce travail a démontré l'utilité d'une méthode directe permettant de détecter l'apparition de souches de VIH-1 résistantes chez les patients séropositifs lors d'un traitement à l'AZT.

INTRODUCTION

Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie incurable causée par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), membre de la famille des *Retroviridae*. Depuis la découverte de l'agent causal, plusieurs drogues antirétrovirales ont été testées dans le but de traiter les personnes infectées par le VIH-1.

Le 3'-azido-3'-déoxythymidine ou AZT a été le premier médicament utilisé comme agent thérapeutique dans la lutte contre le SIDA. Son efficacité à freiner l'évolution de la maladie et à améliorer l'état de santé général des individus traités a été clairement établie. L'AZT inhibe l'activité polymérase de la transcriptase inverse, bloquant ainsi la synthèse de l'ADN proviral à partir de l'ARN viral.

Malheureusement, il a été démontré en laboratoire, qu'une administration prolongée de l'AZT favorise l'émergence de souches virales qui présentent une perte de sensibilité à cette drogue. En effet, l'AZT devient inefficace à ralentir la réplication de ces souches virales en culture de cellules. L'analyse du gène codant pour la transcriptase inverse, enzyme affectée par l'action de l'AZT, a mis en évidence la présence de mutations associées à la résistance à l'AZT; ces mutations étant situées dans les régions variables de l'enzyme.

Les objectifs de ce projet sont d'utiliser une méthode rapide et directe afin de vérifier si, au cours du traitement à l'AZT, il y a apparition d'une population virale ayant subi des mutations associées à la résistance chez des personnes atteintes du SIDA.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1 SYNDROME DE L'IMMUNODÉFICIENCE ACQUISE

C'est en 1981 que le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) a été rapporté pour la première fois aux États-Unis chez de jeunes patients souffrant d'infections opportunistes dont la plus répandue était une pneumonie sévère causée par un protozoaire, le *Pneumocystis carinii*, ainsi que d'une néoplasie très rare qui affecte les cellules mésenchymateuses, le sarcome de Kaposi. Après ces premiers rapports, des cas semblables n'ont pas tardé à être signalés dans d'autres régions du monde (CDC, 1982).

La montée progressive de tels cas a été rapidement suivie par les épidémiologistes qui y ont vu le début d'une épidémie possiblement causée par un agent infectieux transmissible par contact sexuel et par le sang. En général, ces affections étaient accompagnées d'un dysfonctionnement du système immunitaire plus particulièrement de la réponse à médiation cellulaire (Gottlieb et al., 1981; Masur et al., 1981).

Le SIDA est défini par un épuisement des cellules du système immunitaire, plus précisément les lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺). Cette immunodépression ouvre la voie à différentes infections causées par une grande variété de pathogènes opportunistes (viraux, parasitaires, bactériens, fongiques), ainsi qu'à des néoplasies inhabituelles.

L'évolution vers le SIDA se déroule selon des étapes assez bien définies. Généralement, il y a séroconversion à la primo infection mais l'individu demeure asymptomatique pour une longue période de temps. Par la suite, il y a apparition

d'une lymphadénopathie généralisée persistante qui est habituellement accompagnée d'une baisse importante du nombre de lymphocytes T4. Certains symptômes cliniques surviennent tels que fièvre et diarrhée persistantes, perte de poids inexplicée (au moins dix pour-cent du poids total) et apparition d'une anergie. Plus tard, l'individu développera selon son état immunitaire (immunodéficience sévère), des infections opportunistes comme une pneumonie à *Pneumocystis carinii*, des infections par le cytomégalovirus et le virus de l'herpès simplex ou encore différentes néoplasies tels que le sarcome de Kaposi ainsi que certains lymphomes pouvant entraîner la mort. Il peut s'écouler en moyenne de cinq à huit ans entre la primo infection et l'apparition du SIDA.

Le mode de transmission du VIH peut s'effectuer selon trois voies: par des rapports sexuels, par le sang et ses dérivés et de la mère à l'enfant lors des événements périnataux (Redfield et Burke, 1987).

Les Centres de Surveillance des Maladies (Atlanta, Georgie, USA) ont récemment ajouté un second critère au système de classification pour l'infection par le VIH soit le décompte des lymphocytes T4 (CD4+) (CDC, 1992); ces derniers étant la cible principale du VIH. En déterminant le nombre de lymphocytes (nombre de cellules par μl de sang) d'un patient il est alors possible de vérifier l'état immunitaire de ce dernier et ainsi planifier une thérapeutique plus adaptée.

2 VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE

2.1 Historique

L'agent étiologique du SIDA a été isolé pour la première fois en France par Barré-Sinoussi et al. (1983), à partir de cellules prélevées d'un ganglion lymphatique qui provenait d'un patient souffrant d'une lymphadénopathie cervicale. Le nom de «lymphadenopathy-associated virus» (LAV) lui a été attribué.

Un peu plus tard, deux autres souches virales ont été isolées de patients sidéens soit le «human T-cell lymphotropic virus type III» (HTLV-III) (Gallo et al., 1984) et le «AIDS-associated retrovirus» (ARV) (Levy et al., 1984). Puisqu'il a été démontré que ces différents isolats viraux causaient le SIDA, le Comité International sur la Taxonomie des Virus (CITV) a adopté un nom international qui engloberait ce groupe de virus soit le «human immunodeficiency virus» ou HIV (en français VIH pour virus de l'immunodéficience humaine) (Coffin et al., 1986).

2.2 Classification

Le VIH-1 fait partie de la famille des *Retroviridae*, elle-même divisée en sept genres: les rétrovirus de type B, C ou D, les rétrovirus aviaires, les virus HTLV-BLV, les spumavirus et les lentivirus (Franki et al., 1991). Les rétrovirus ont été regroupés selon leur morphologie (type B-C-D ou autre) et leur structure génomique (revue par Coffin, 1990). Selon cette classification le VIH de type 1 et 2 se retrouvent dans le groupe des lentivirus.

Les rétrovirus sont largement répandus chez les vertébrés (mammifères, oiseaux, reptiles). Ils sont associés à plusieurs maladies à caractère malin (leucémies, lymphomes, sarcomes), à des déséquilibres neurologiques ainsi qu'à des immunodéficiences tel que le SIDA (Coffin, 1990).

Malgré le grand éventail d'hôtes et leurs effets pathogènes diversifiés, les rétrovirus restent globalement similaires entre eux tant au niveau de la structure du virion, de l'organisation génomique ainsi que dans leur mode de réplication.

2.3 Structure

2.3.1 Morphologie du VIH

Un schéma du virion est représenté à la figure 1. Le virion dont le diamètre est d'environ 110 nm, possède une enveloppe qui est constituée d'une double couche lipidique (Gelderblom *et al.*, 1989). L'enveloppe est également composée de deux glycoprotéines d'origine virale dont l'une d'entre elles forme des projections à la surface du virion. Une matrice protéique d'aspect icosadeltahédrale sépare l'enveloppe de la capsid. C'est cette matrice qui donnerait la forme quasisphérique du virus (Marx *et al.*, 1988). La nucléocapside (ribonucléoprotéine), qui est située à l'intérieur de la capsid, est composée du génome viral intimement associé à des protéines basiques. Une enzyme, la transcriptase inverse (RT), est également associée à la nucléocapside; elle est essentielle à la réplication du virus.

Figure 1: Représentation schématique du VIH-1 avec ses principales composantes (tirée d'Arnold et Arnold,1991).

MA: matrice

IN: intégrase

CA: capsid

PR: protéase

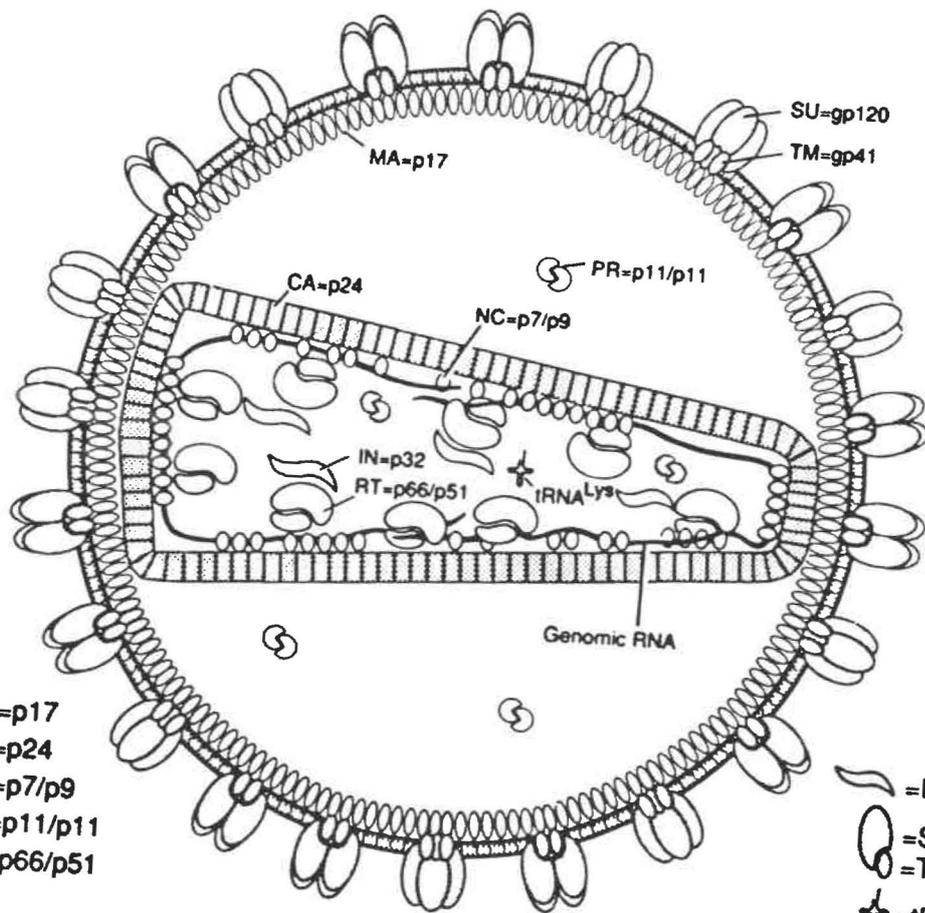
NC: nucléocapsid

RT: transcriptase inverse

TM: glycoprotéine transmembranaire

SU: glycoprotéine de surface

Genomic RNA: ARN génomique



-  =MA=p17
-  =CA=p24
-  =NC=p7/p9
-  =PR=p11/p11
-  =RT=p66/p51

-  =IN=p32
-  =SU=gp120
-  =TM=gp41
-  =tRNA^{Lys}

2.3.2 Génome et protéines virales

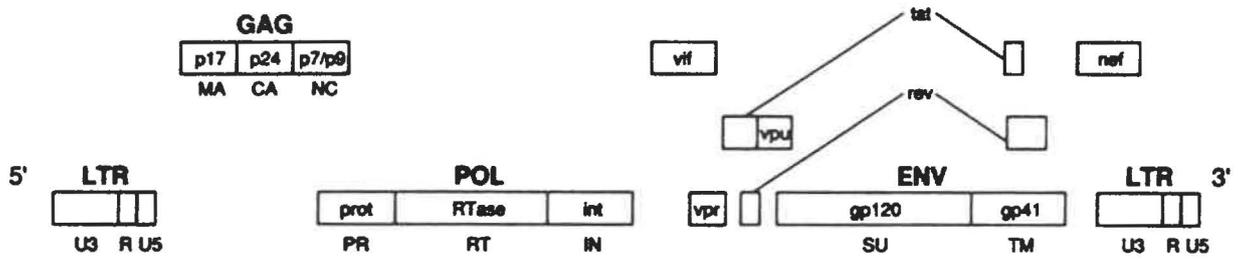
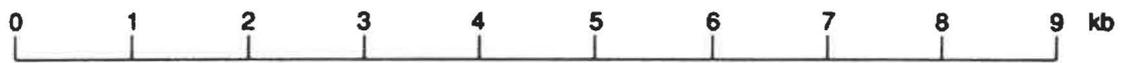
Le génome des rétrovirus est composé d'un dimère d'ARN simple brin à polarité positive. Chaque molécule d'ARN compte entre 7 et 10 kilobases (Kb) selon le genre auquel appartient le virus. Dans le cas d'isolats du VIH-1, les molécules d'ARN ont une longueur moyenne de 9 749 nucléotides; elles sont polyadénylées et coiffées. Le schéma de la figure 2 représente l'organisation génomique de l'ADN proviral du VIH-1.

Chaque extrémité du génome proviral est flanquée de la séquence U3-R-U5, commune à tous les rétrovirus. Ce sont les «long terminal repeat» (LTR); ces séquences non codantes contiennent des signaux de reconnaissance impliqués dans la synthèse et la maturation de l'ADN ou de l'ARN (revue par Coffin, 1990). Les LTR jouent également un rôle important dans l'expression des gènes viraux par la présence d'un puissant promoteur ainsi que dans l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN cellulaire de l'hôte (revue par Coffin, 1990).

La région située entre les deux LTR, présente chez tous les rétrovirus, est caractérisée par l'enchaînement successif des gènes *gag-pol-env* dans l'orientation 5'—>3'. Les autres gènes, particuliers au VIH, sont des gènes régulateurs ou accessoires. Ce sont: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu*; ce dernier n'ayant été décrit que chez le VIH-1.

Figure 2: Représentation schématique de l'organisation génomique du VIH-1 (tirée d'Arnold et Arnold, 1991).

L'ADN proviral, bordé aux extrémités par les LTR, est composé des gènes *gag* et *env* qui codent pour les protéines structurales, du gène *pol* qui code pour les enzymes virales et de six gènes régulateurs.



Le gène *gag* code pour quelques-unes des protéines structurales du virus. Un ARN messager (ARNm) complet est traduit en une polyprotéine de 55 kilodaltons (KDa) qui est myristilée à la position N-terminale (revues par Arnold et Arnold, 1991; Coffin, 1990). Par la suite, cette polyprotéine est clivée par une protéase virale en trois polypeptides: la protéine de la matrice (MA ou p17), la protéine de la capsid (CA ou p24) et la protéine p15 (revue par Arnold et Arnold, 1991). Cette dernière subit un autre clivage protéolytique pour donner les deux protéines de la nucléocapsid (NC) c'est-à-dire la p7 et la p9 (Gelderblom *et al.*, 1989).

La p17 est intimement associée à l'enveloppe virale par la présence de l'acide myristique. Cette protéine sous la forme myristilée est impliquée dans le processus d'assemblage des virions et dans la maturation des protéines du gène *gag* (revues par Arnold et Arnold, 1991; Coffin, 1990). De plus, elle semble être nécessaire à l'incorporation des glycoprotéines de l'enveloppe dans les particules virales (Yu *et al.*, 1992).

La p24 est la constituante majeure de la capsid; elle est essentielle au processus d'assemblage (revue par Coffin, 1990). Comme pour la p17, la p24 est phosphorylée, cependant le rôle fonctionnel de ces modifications reste encore inconnu (Arnold et Arnold, 1991).

Finalement, la p7 et la p9 qui sont de petites protéines basiques et phosphorylées, sont intimement associées au génome viral (revue par Arnold et Arnold, 1991; Coffin, 1990). Les protéines de la nucléocapsid sont requises pour l'encapsidation de l'ARN génomique (Gelderblom *et al.*, 1989) et

l'attachement de l'amorce sur le génome viral pour permettre l'initiation de la transcription par la transcriptase inverse (RT) (revue par Arnold et Arnold, 1991).

Le gène *pol* code pour trois enzymes essentielles à la réplication du virion: la protéase (PR ou p11) qui a pour fonction de cliver les précurseurs codés par les gènes *gag* et *pol* (revue par Arnold et Arnold, 1991), la transcriptase inverse (RT ou p66/51) qui est responsable de la transcription de l'ARN viral en un ADN double brin, le provirus, et finalement l'intégrase (IN ou p32) qui permet l'intégration du provirus dans les chromosomes de la cellule hôte (revue par Arnold et Arnold, 1991). Ces enzymes sont produites suite au clivage protéolytique d'une polyprotéine de 160 KDa. Cette polyprotéine est traduite à partir du même transcrit primaire utilisé pour les protéines du gène *gag*. En effet, lors de la lecture du messenger par les ribosomes, un changement de cadre de lecture s'effectue à un moment précis par le glissement d'un anticodon (aminoacyl-ARNt) sur les ribosomes, et ainsi permettre l'expression du gène *pol*. Ce mécanisme de changement de cadre de lecture a été mis en évidence chez quelques rétrovirus (Jacks et Varmus, 1985; Jacks et al., 1987) ainsi que chez le VIH-1 (Jacks et al., 1988; Wilson et al., 1988).

Le gène *env* code pour une glycoprotéine précurseur de 160 KDa. Après un clivage protéolytique d'origine cellulaire, deux glycoprotéines sont produites: une glycoprotéine de 120 KDa (gp120) qui forme les projections de surface, et une glycoprotéine de 41 KDa (gp41) qui est une protéine transmembranaire. Ces glycoprotéines sont les constituantes majeures de l'enveloppe que le virus

acquiert lors du bourgeonnement. La gp120 est responsable de la reconnaissance du récepteur CD4 par le virion ainsi que de la fusion cellulaire (revue par Arnold et Arnold, 1991); la gp41 ancrée dans l'enveloppe virale interagit, par sa région externe, avec gp120 par des liens non-covalents. Elle joue également un rôle important dans la fusion cellulaire (revue par Arnold et Arnold, 1991). Contrairement aux gènes *gag* et *pol*, le gène *env* est traduit d'un ARN messager épissé (revue par Coffin, 1990).

Le gène *tat* joue un rôle essentiel dans la réplication virale. Il code pour une petite protéine d'environ 86 acides aminés (14 KDa). Cette protéine est le produit de traduction de trois exons réunis après épissage de l'ARNm transcrit. Le premier exon, du côté 5', est non codant et contient le site d'initiation de la transcription commun à tous les ARNm. Les deux autres exons sont codants et proviennent d'une part de la région située entre *pol* et *env* et d'autre part de la région 3' de *env* (revues par Wong-Staal, 1990; Arnold et Arnold, 1991). Cette protéine qui est essentiellement concentrée dans le noyau des cellules infectées (revue par Cullen et Greene, 1990), augmente l'expression des gènes viraux par interaction en *trans* sur une séquence nucléotidique nommée TAR (trans-activation responsive region). Cette séquence est localisée juste en aval du site d'initiation de la transcription (agit en position *cis*) donc présente sur tous les transcrits viraux.

C'est ainsi que *tat* par l'intermédiaire de TAR, permettrait la transcription complète des ARNm, augmenterait la stabilité des ARNm et l'efficacité de la traduction de ces mêmes messagers (revues par Cullen et Greene, 1990; Arnold et Arnold, 1991).

Le gène *rev* joue également un rôle de régulation dans la réplication virale des lentivirus. Il code pour une protéine de 20 KDa obtenue après traduction d'un ARNm ayant subi un double épissage (revue par Wong-Staal, 1990). Son rôle est de favoriser l'exportation dans le cytoplasme des ARNm (non épissés) codant pour les protéines structurales en interagissant avec une séquence nucléotidique, le RRE (*rev responsive element*) (Malim *et al.*, 1989; Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1989). Cette séquence est localisée dans la région *env* juste en amont de la séquence qui code pour la gp41 (Malim *et al.*, 1989; Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1989). Le mécanisme d'action du RRE n'est pas encore connu.

Par ailleurs, l'absence du RRE amène l'effet contraire c'est-à-dire une diminution des messagers non épissés dans le noyau et le cytoplasme et une augmentation des ARNm épissés, ceux-ci codant pour les protéines de régulation. Cette régulation est induite par la présence d'une séquence répressive, la CRS (*cis-acting repressing sequence*) (Rosen *et al.*, 1988), située sur les ARNm des gènes structuraux (revue par Cann et Karn, 1989). Récemment, il a été démontré que l'élimination du CRS dans le gène *gag* amène une expression élevée des protéines de ce gène et ce en l'absence de *rev* (Schwartz *et al.*, 1992).

Le gène *nef* est situé dans la région terminale du gène *env*. Il code pour une protéine de 27 KDa, phosphorylée et myristilée, qui est associée à la membrane cytoplasmique (Rimsky *et al.*, 1988). L'ARNm du gène *nef* est obtenu à la suite d'une série d'épissages des transcrits primaires de l'ARN. Le rôle du gène *nef* est encore très controversé, mais il pourrait jouer un rôle de régulation négative dans la réplication virale (Fisher *et al.*, 1986; Luciw *et al.*, 1987). En effet, une délétion

dans le gène *nef* amène une augmentation de la production de particules virales (Fisher et al., 1986; Luciw et al., 1987). De plus, le produit du gène *nef* inhibe l'activité des LTR en agissant en position *trans* sur un élément à régulation négative, le NRE (negative regulatory element), localisé dans ces mêmes LTR (Ahmad et Venkatesan, 1988).

Parallèlement, Kim et al. (1989) ainsi que Hammes et al. (1989) ont rapporté que le gène *nef* n'aurait aucun effet négatif ni sur la réplication virale ni sur l'expression des gènes. De plus, Munis et al. (1992) ont observé que le gène *nef* était le premier ARNm à être transcrit lors d'une cinétique d'infection avec le VIH-1. Cette observation concorde avec les travaux antérieurs de Robert-Guroff et al. (1990) qui ont montré au cours de la réplication du VIH-1 la présence précoce et abondante de l'ARNm du gène *nef*.

Le rôle exact que peut jouer le gène *nef* sur la réplication du virus et son mécanisme d'action fait encore l'objet de plusieurs spéculations. Cependant, la présence de ce gène chez les lentivirus de primates suggère un rôle significatif de son produit dans le cycle de réplication du VIH-1 (Cullen et Greene, 1990).

Le gène *vif* code pour une protéine de 192 acides aminés (23 KDa) qui apparaît tardivement dans le cycle de réplication du VIH-1. Le rôle de cette protéine n'a pas encore été élucidé, cependant il a été démontré que le VIH-1 pouvait établir une infection stable dans des lignées cellulaires permissives en l'absence de la protéine *vif* mais que l'infection s'établissait plus lentement (Sakai et al., 1991; Fan et Peden, 1992). Par contre aucune infection n'a pu être établie

dans des cellules primaires (cellules monocytaires du sang périphérique) en l'absence de *vif* (Fan et Peden, 1992). Ceci suggère que le gène *vif* est essentiel pour la réplication du VIH-1 dans les cellules primaires donc qu'il jouerait possiblement un rôle indispensable *in vivo* (Fan et Peden, 1992).

D'autres travaux suggèrent que le produit du gène *vif* aurait une activité protéolytique ayant une spécificité de type protéase à cystéine (Guy *et al.*, 1991). Cette protéase serait impliquée dans le processus de maturation des protéines de l'enveloppe en clivant la portion C-terminale de la gp41 (Guy *et al.*, 1991).

Le gène *vpr* code pour une petite protéine de 96 acides aminées (15 KDa) (Cohen *et al.*, 1990a) dont la fonction n'est pas bien connue. Les travaux de Cohen *et al.* (1990a) suggèrent que la protéine *vpr* augmente la vitesse de réplication du VIH-1 dans les lymphocytes CD4⁺ ainsi que son effet cytopathique. La protéine codée par *vpr* est également retrouvée en association avec les particules virales matures ce qui suggère un rôle important dans le processus d'infection virale (Cohen *et al.*, 1990b).

Finalement, le gène *vpu* présent que chez le VIH-1, est traduit en une protéine de 16 KDa depuis le même ARN messager que le gène *env* (Schwartz *et al.*, 1990). Certains travaux (Strebel *et al.*, 1989; Terwilliger *et al.*, 1989) suggèrent que la protéine codée par le gène *vpu* favoriserait le transport des particules virales hors des cellules infectées et ce indépendamment des protéines de l'enveloppe et de la protéine CD4 (Yao *et al.*, 1992). La maturation de la gp160 serait aussi facilitée par la protéine *vpu*, et ce, par la déstabilisation des complexes intracellulaires gp160-CD4 (Willey *et al.*, 1992).

2.4 La transcriptase inverse

La transcriptase inverse (RT) ou ADN polymérase ARN-dépendante du VIH-1 ainsi que celle d'autres rétrovirus a pour fonction de copier l'ARN viral en ADN à double brin pouvant s'intégrer au génome de la cellule hôte.

La première étape de la transcription consiste à synthétiser, à l'aide de l'activité polymérase de la RT, le premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) négatif à partir de l'ARN viral en utilisant comme amorce un ARNt. Par la suite, le brin d'ARN viral de l'hybride ARN:ADN est dégradé à l'aide de l'activité ribonucléase H (RNase H) de la RT afin de permettre la seconde étape de la transcription qui consiste à copier le deuxième brin de l'ADNc (revue par Hizi et al., 1990).

La RT est active sous forme d'un hétérodimère composé des sous unités p66 (66 KDa) et p51 (51 KDa) (Restle et al., 1990). Elle présente deux domaines catalytiques: un à activité polymérase situé dans la région N-terminale et l'autre à activité ribonucléase H localisé dans la portion C-terminale de la RT (Johnson et al., 1986).

Contrairement à d'autres RT, les deux domaines de la RT du VIH-1 sont fonctionnellement interdépendants puisque des mutations dans la portion N-terminale affectent l'activité RNase H, alors que la polymérisation est perturbée lorsque des mutations sont provoquées dans la portion C-terminale de l'enzyme (revue par Jacobo-Molina et Arnold, 1991).

Des études comparatives de séquences en acides aminés de différentes RT rétrovirales ont permis de mettre en évidence des régions homologues dans les domaines de la polymérase et de la RNase H (Johnson *et al.*, 1986). Parmi ces homologues, un motif hautement conservé (séquence consensus) dans le domaine de la polymérase a été identifié chez les ARN polymérases ARN-dépendante (non rétrovirales) (Kamer et Argos, 1984) ainsi que chez des ADN polymérases ADN-dépendante (Argos, 1988). Cette séquence est composée des acides aminés suivants: Tyr-X-Asp-Asp (YXDD). Le fait qu'il existe des séquences très conservées chez les RT, suggère qu'elles jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement de l'enzyme. Ces séquences, réparties dans différentes régions (figure 3), sont principalement localisées dans les 271 premiers acides aminés, c'est-à-dire où se situerait le domaine catalytique de la polymérase (Lindborg, 1992).

Une région très peu conservée, située entre le domaine polymérase et le domaine RNase H, servirait de jonction entre les deux sites fonctionnels de l'enzyme (Johnson *et al.*, 1986).

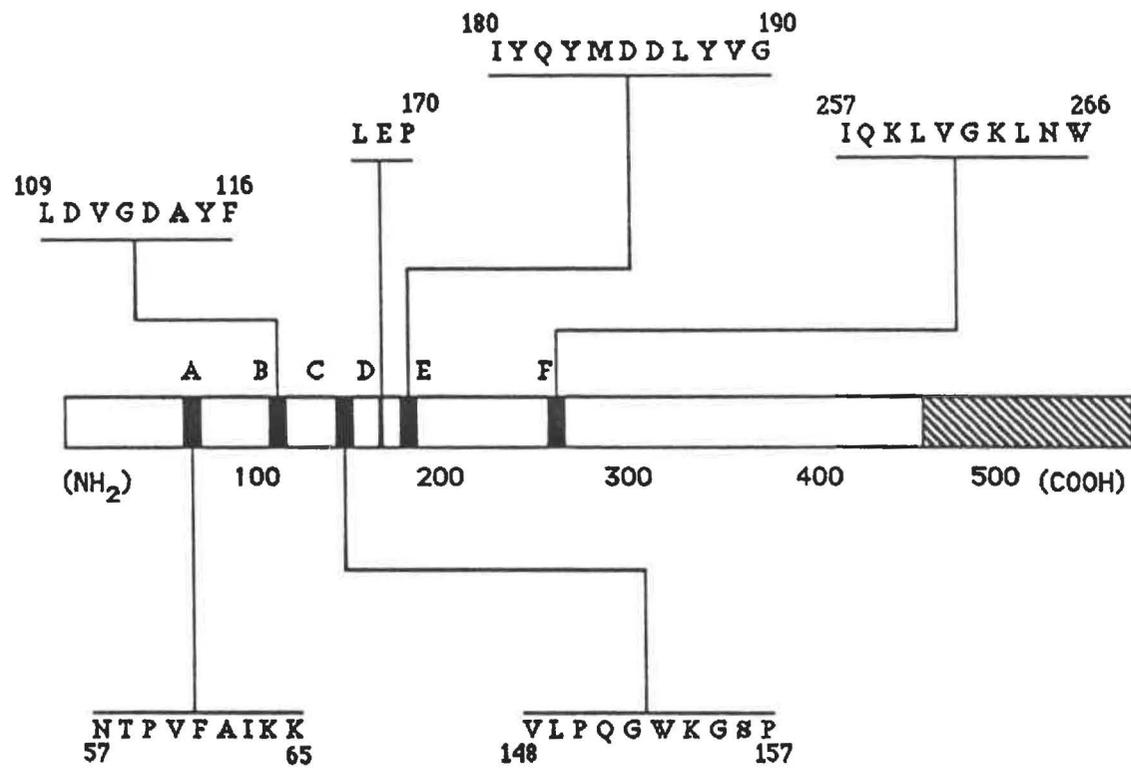
Plusieurs travaux ont été effectués afin de déterminer l'importance de ces régions ainsi que leur relation avec la structure de la RT. Citons les travaux de Larder *et al.* (1987, 1989b) ainsi que ceux de Boyer *et al.* (1992a) qui ont effectué des substitutions dans la région E (figure 3) contenant la séquence consensus YXDD; ces altérations, plus particulièrement aux positions D185 et D186, ont entraîné une perte complète de l'activité polymérase de la RT sans que l'activité RNase H soit altérée (Boyer *et al.*, 1992a).

Des substitutions ont également été effectuées dans d'autres motifs très conservés parmi les RT soit le motif Asp-X-X-Asp (DXXD) retrouvé dans la région B et Ile-Lys-Lys-Lys (IKKK) situé dans la région A. Seules les variations localisées au niveau des acides aminés D110 et K65 induisent une perte de l'activité polymérase (Larder *et al.*, 1987, 1989b; Boyer *et al.*, 1992a), tout en préservant celle de la RNase H (Boyer *et al.*, 1992a). Ces régions seraient donc situées dans le site catalytique de la polymérase.

Les présumées fonctions attribuées à ces régions ont été récemment confirmées lorsque la structure tridimensionnelle de la RT du VIH-1 a pu être déterminée (Kohlstaedt *et al.*, 1992; Arnold *et al.*, 1992).

Figure 3: Structure de la RT avec ses deux domaines catalytiques (d'après Larder et al., 1987).

Le domaine de la RNase H (en hachuré), et le domaine de la polymérase sont représentés. Les chiffres correspondent aux positions des acides aminés; les traits noirs sont les régions conservées (A à F) chez les RT. La séquence en acides aminés (code des acides aminés) pour chacun d'entre eux est donnée; les espaces blancs représentent les régions variables.



3 THÉRAPEUTIQUE

3.1 Stratégies antivirales

Une infection par le VIH ne se guérit pas; mais il est cependant possible d'en retarder l'évolution dont l'issue est inévitablement fatale.

En effet, plusieurs substances antivirales peuvent intervenir à différents stades dans le cycle de réplication virale. Par exemple, certaines drogues peuvent empêcher l'entrée du virus en bloquant l'attachement et le fusionnement de ce dernier à la cellule cible (revue par Mitsuya *et al.*, 1991); d'autres peuvent inhiber les enzymes virales essentielles à la transcription et à l'intégration du provirus c'est-à-dire la RT ainsi que la RNase H et l'intégrase (revue par Mitsuya *et al.*, 1991). Il est également possible d'intervenir à l'étape traductionnelle et post-traductionnelle et finalement dans le processus de maturation et de bourgeonnement du virus (revue par Mitsuya *et al.*, 1991).

Parmi toutes ces cibles potentielles, celle qui a suscité le plus de recherche est sans aucun doute la RT. Le fait que cette enzyme soit absente chez les cellules humaines fait d'elle une cible de choix pour le développement de nouvelles thérapies antivirales. D'ailleurs, le premier médicament approuvé pour une utilisation clinique à grande échelle contre le VIH-1 est un inhibiteur de la RT soit le 3'-azido-3'-déoxythymidine, mieux connu sous le nom d'AZT (zidovudine).

3.2 Zidovudine (AZT)

3.2.1 Activité antivirale

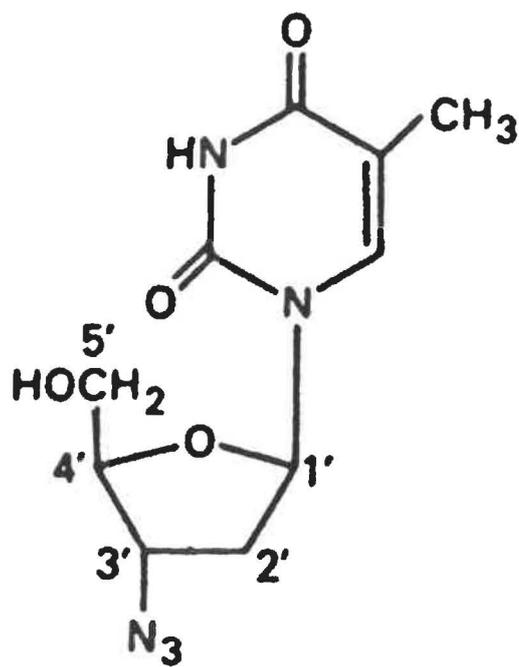
Les effets inhibiteurs de l'AZT *in vitro* sur la RT du VIH-1 ont été mis en évidence par Mitsuya et al. (1985). Ils ont observé que cet analogue de la thymidine (figure 4) inhibait complètement la réplication du virus et bloquait les effets cytopathiques. L'AZT n'a aucun effet antiviral sur les particules virales extracellulaires (revue par Langtry et Campoli-Richards, 1989).

L'efficacité de l'AZT *in vivo* a pu être établie à la suite d'un premier essai sur dix-neuf patients atteints du SIDA (Yarchoan et al., 1986). Suite à cet essai, d'une durée de six semaines, les patients sous traitement ont montré un gain de poids, une amélioration de l'état immunitaire et un certain bien-être. De plus, les auteurs ont constaté que l'AZT a amené une augmentation des lymphocytes T4 et une disparition de l'anergie.

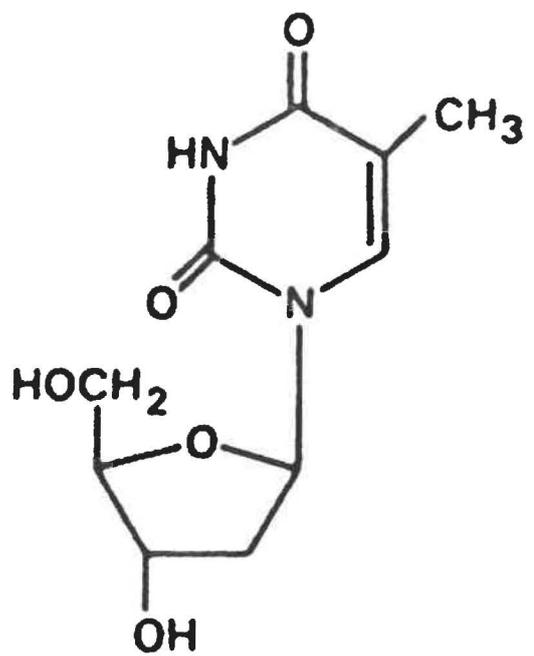
Afin de valider ces premières données encourageantes, un second essai, de plus grande envergure, a été amorcé avec 282 patients pendant une période de 24 semaines (Fischl et al., 1987). Lors de cet essai la moitié des sujets étaient traités à l'AZT, l'autre moitié recevait un placebo. Après 16 semaines, les auteurs ont décidé de mettre fin à l'essai dû à un nombre de mortalité significativement beaucoup plus élevé dans le groupe qui recevait le placebo. En effet, sur les 20 décès rapportés un seul provenait du groupe traité à l'AZT; ce patient avait cessé de recevoir la médication.

Après avoir démontré que l'AZT prolongeait et améliorait la qualité de vie des patients atteints du SIDA, d'autres essais ont été effectués pour permettre l'administration de l'AZT chez les individus qui n'en sont qu'aux premiers stades de la maladie. Les résultats ont démontré que les chances de survie chez ces individus étaient meilleures (revue par Connolly et Hammer, 1992).

Figure 4: Structures moléculaires du 3'-azido-3'-déoxythymidine et de la thymidine.



3'-azido-3'-déoxythymidine



Thymidine

3.2.2 Mécanisme d'action

L'AZT bloque la réplication du VIH via un double processus: inhibition de la transcriptase inverse et arrêt de l'élongation de la chaîne d'ADN viral (Mitsuya et al., 1985; St. Clair et al., 1987). Étant un analogue de la thymidine, l'AZT devient un inhibiteur compétitif de la thymidine en bloquant l'incorporation de cette dernière dans l'ADN viral par la RT. Comme il cause une diminution du niveau de thymidine triphosphate dans les cellules, l'attachement de l'AZT à la RT sera donc favorisé (Furman et al., 1986). Finalement, de par son groupement azide (N_3) l'AZT, lorsqu'intégré dans la chaîne d'ADN viral, termine prématurément l'élongation de cette même chaîne en empêchant la formation du lien phosphodiester avec le nucléotide suivant (Furman et al., 1986; St. Clair et al., 1987).

L'efficacité de l'AZT est retrouvée uniquement sous sa forme triphosphate. Cette phosphorylation est effectuée par des enzymes cellulaires via la même voie métabolique de la thymidine (Furman et al., 1986).

Il a également été démontré que l'AZT inhibait sélectivement la RT du VIH-1, son affinité pour cette enzyme étant d'environ 300 fois supérieure que pour les polymérases cellulaires (Furman et al., 1986).

3.2.3 Effets secondaires

Une évaluation des effets secondaires survenus suite à l'administration de l'AZT a été effectuée (revue par Connolly et Hammer, 1992). Les effets toxiques les plus importants apparus chez les patients recevant l'AZT sont d'ordre hématologiques: neutropénie, leucopénie, anémie et thrombopénie. D'autres effets comme des myalgies, des maux de tête, et des nausées se sont également manifestés. Des études sur le sujet abondent dans la littérature (CDC, 1990; Dournon *et al.*, 1988; Richman *et al.*, 1987).

3.2.4 Résistance

Outre les effets toxiques que peut occasionner l'AZT, une autre complication possible peut survenir chez les individus en thérapie prolongée et c'est l'apparition de souches virales résistantes à la drogue (Bach, 1989). En effet, plusieurs équipes (Larder *et al.*, 1989a; Rooke *et al.*, 1989; Land *et al.*, 1990) ont isolé, dans des cultures cellulaires, des souches virales dont la sensibilité face à l'AZT était diminuée (souches résistantes). Ces variants provenaient de patients sous traitement à l'AZT depuis plus de dix mois. L'analyse séquentielle de la RT de ces souches avant et pendant un traitement prolongé, a permis de mettre en évidence des substitutions au niveau de quatre acides aminés: le changement de l'Asp⁶⁷ en Asn, Lys⁷⁰ en Arg, Thr²¹⁵ en Phe ou Tyr et finalement Lys²¹⁹ en Gln (Larder et Kemp, 1989). Cette résistance virale, conférée par ces substitutions, a été confirmée par la construction d'un clone VIH-1 infectieux possédant les

mutations (Larder et Kemp, 1989; Larder *et al.*, 1991b).

Il a été par la suite possible de reproduire en laboratoire ces mutations chez une souche virale sensible à l'AZT après plusieurs passages successifs en culture cellulaire en présence de cette drogue (Larder *et al.*, 1991a).

D'autres mutations dans la RT pouvant être impliquées dans la résistance à l'AZT ont été rapportées chez des isolats de VIH de patients sous traitement prolongé (Japour *et al.*, 1991).

Malgré la présence *in vivo* de souches de VIH-1 résistantes à l'AZT, il n'existe présentement aucune corrélation entre l'apparition de ces variants et la progression de la maladie chez les individus en thérapie. Par contre, il a été démontré *in vitro* que ces souches résistantes sont beaucoup plus cytopathogènes que les souches d'origine (avant le traitement) (Tremblay *et al.*, 1992).

3.3 Autres inhibiteurs de la transcriptase inverse

Les résultats encourageants obtenus avec l'AZT, au cours d'essais cliniques, ont conduit à la recherche et au développement de nouveaux composés pouvant inhiber la RT tout en étant moins toxique (revue par Connolly et Hammer, 1992). Certains d'entre eux ont prouvé leur efficacité en clinique et sont utilisés comme substitut à l'AZT. Il s'agit du 2',3'-didéoxynosine (ddI) et du 2',3'-didéoxycytidine (ddC) (revue par Connolly et Hammer, 1992). Malheureusement, l'apparition *in*

vivo de souches résistantes au ddl (St. Clair et al., 1991) et au ddC (revue par Richman, 1992) ont été rapportées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 ÉCHANTILLONS

1.1 Échantillons cliniques

Les extraits d'ADN cellulaire utilisés pour la réaction de polymérisation en chaîne (RPC) proviennent des cellules du sang périphérique d'individus séropositifs pour le VIH-1. Ils nous ont été gracieusement remis par le Dr. Sharon Cassol du Centre d'Excellence VIH/SIDA (Vancouver, Colombie-Britannique) et le Dr. John Gill, Hôpital Foothills (Calgary, Alberta).

Tous les échantillons ont été préparés à partir du protocole mis au point par le Dr. Cassol. L'extraction de l'ADN a été effectuée de la façon suivante: le sang récolté par ponction veineuse (5 à 10 ml) est passé sur un gradient de Ficoll-Hypaque afin de purifier les lymphocytes et les monocytes. La fraction du gradient contenant les cellules a été prélevée et lavée une fois dans le tampon PBS (tampon phosphate à pH 7,4). Le culot de cellules a été resuspendu dans un microtube de 1,5 ml contenant 1 ml de PBS et les cellules ont été dénombrées à l'aide d'un hématimètre. La suspension cellulaire a été centrifugée de nouveau à basse vitesse. Le culot a été resuspendu à une concentration de 6×10^6 cellules/ml dans la solution A (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, KCl 100 mM, MgCl₂ 2,5 mM) et agité brièvement au vortex. Un volume égal de la solution B (Tris-HCl 10 mM à pH 8,3, MgCl₂ 2,5 mM, Tween 20 1,0% et NP-40 1,0%) a été ajouté ainsi que 60 µg/ml de protéinase K fraîchement préparée. Le mélange a été incubé pendant 1 heure à 56°C pour permettre la lyse des cellules. La protéinase K a été dénaturée en incubant 10 minutes à 95°C. Après refroidissement à la

température de la pièce, le lysat cellulaire a été aliquoté dans des microtubes de 0,5 ml à une concentration finale de 150 000 cellules/25 µl et a été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

1.2 Échantillons témoins

Les échantillons utilisés comme témoins négatifs proviennent de cellules de donneurs séronégatifs. Ces échantillons ont été traités de la même façon que les échantillons cliniques.

L'ADN des cellules 8E5 (Folks *et al.*, 1986) a été utilisé comme témoin positif pour la RPC. Cette lignée cellulaire qui contient une copie de l'ADN proviral du VIH-1 par cellule, a été traitée en utilisant la procédure décrite dans la section 1.1 sans l'étape de purification sur un gradient de Ficoll. Suite à l'extraction, l'ADN a été dilué dans les cellules de donneurs séronégatifs afin d'obtenir un nombre décroissant de copie d'ADN du VIH-1 tout en conservant la même quantité d'ADN total.

2 RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (RPC)

Pour obtenir une quantité suffisante d'ADN amplifié afin d'effectuer le clonage, deux RPC ont été réalisées successivement en utilisant deux paires d'amorces.

La sélection des amorces s'est faite à l'aide des séquences de différentes souches de VIH-1 répertoriées. Ces amorces ont été choisies dans la région *pol* du VIH-1 plus précisément dans le gène de la transcriptase inverse. Les amorces SC67F et RT-1 correspondent à la séquence du brin positif du côté 5' tandis que les amorces SC219R et RTF-2 sont complémentaires au brin positif du côté 3' (figure 5). La première RPC, effectuée à l'aide des amorces SC67F et RTF-2, génère un fragment de 820 paires de base (pb) (figure 6); la seconde RPC, effectuée avec les amorces RT-1 et SC219R, va donner un fragment de 629 pb qui est situé à l'intérieur du premier produit d'amplification (figure 6).

La première amplification a été effectuée à partir d'un mélange réactionnel contenant 22 µl d'eau distillée stérile, 5 µl de tampon de réaction 10X (Tris-HCl 100 mM pH 9,0 à 25°C, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM, gélatine 0,1% (p/v) et Triton X-100 1%) (Bio/Can Scientific, Mississauga, Canada), 5 µl d'un mélange de nucléotides (dCTP, dATP, dGTP et dTTP, concentration finale de 200 µM chacun), 2,5 µl de chaque oligonucléotide soit SC67F et RTF-2 (concentration finale de 0,5 µM) et 0,5 µl de polymérase *Taq* (5 U/ml) (Bio/Can). L'échantillon, préalablement dénaturé pendant 10 minutes à 100°C et gardé sur glace, a été ajouté au mélange soit 12,5 µl (500 ng d'ADN total). Un volume de 50 µl d'huile minérale a

été déposé au-dessus du mélange pour éviter l'évaporation lors des changements de température pendant les cycles d'amplification. La réaction d'amplification s'est effectuée à l'aide de l'appareil «DNA Thermal Cycler» (Perkin Elmer Canada Ltée, Montréal, Canada) dont les cycles thermiques ont été programmés de la façon suivante: dénaturation de l'ADN cible à 95°C pendant 45 sec, appariement des amorces à 55°C pendant 45 sec et élongation à 72°C pendant 1 min. La durée de l'élongation a été augmentée de 3 sec à chaque cycle. Après 35 cycles, l'huile minérale est extraite en ajoutant un volume de chloroforme:alcool isoamyl (24:1) et centrifugé pendant 30 secondes à 12 000 x g. La phase aqueuse a été récoltée et transférée dans un microtube propre.

Figure 5: Amorces utilisées pour la réaction de polymérisation en chaîne (RPC).

L'inosine (I) est utilisée aux endroits où une variation dans la séquence nucléotidique a été observée lors de l'alignement des séquences du VIH-1 répertoriées dans GeneBank.

SC67F: 5'-CCTATTGAIACTGTACCAGTAAAATTAA-3'

RTF-2: 5'-TTACTTTAATICCTGIITAAATITGICTTGCCCA-3'

RT-1: 5'-GGGCCTGAIAATCCATACAATACTCC-3'

SC219R: 5'-AAITTCTGTAT(AG)TCATTGACAGTCCAGC-3'

Figure 6: Représentation schématique du fragment de 820 pb de la RT du VIH-1 avec les quatres amorces.

La séquence des amorces SC67F et RTF-2, utilisées lors de la première RPC et qui générera un fragment de 820 pb est soulignée; la séquence des amorces RT-1 et SC219R, employées pour la deuxième RPC et qui donnera un fragment de 629 pb est présentée en caractère gras.

SC67F

50

CCTATTGAIACTGTACCAGTAAAATTAAAGCCAGGAATGGATGGCCCCAAAAGTTAAACAATGGCCAT

100

TGACAGAAGAAAAATAAAAGCATTAGTAGAAATTTGTACAGAAATGGAAAAGGAAGGGAAAATTC

150 RT-1

AAAAATTGGGCTGAI**AATCCATAACAATACTCC**AGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTAC

200

250

TAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAA

300

TTAGGAATACCCACATCCCGCAGGGTTAAAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGTGATG

350

CATATTTTTCAGTTCCCTTAGATGAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACCTAGTATAAA

400

450

CAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCA

500

ATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAAAAAACAAAATCCAGACATAGTTATCT

550

ATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGA

600

650

GGAGCTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGACTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCT

700

CCATTCCTTTGGATGGGTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAG

750 SC219R

AAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAITTAGTGGGGAAATTGAATTGGGCAAGIC

800 RTF-2

AIATTTALICAGGIATTAAAGTAA

La deuxième réaction d'amplification a été effectuée à partir de l'ADN amplifié obtenu lors de la première RPC. Pour ce faire, 0,5 μ l de ce dernier a été mélangé aux dNTP, au tampon de réaction et à la polymérase *Taq* dans les mêmes concentrations utilisées précédemment. Seules les amorces utilisées sont différentes (RT-1 et SC219R). Le volume a été complété à 50 μ l avec de l'eau distillée et 50 μ l d'huile minérale ont été ajoutés. Les conditions utilisées ont été les mêmes que ceux programmées pour la première RPC.

À la fin du dernier cycle l'huile minérale a été extraite selon la méthode décrite ci-dessus. L'efficacité de l'amplification a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose. Un gel d'agarose de 0,8% a été préparé dans le tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM et le pH ajusté à 7,8 avec l'acide acétique glacial). Dans des puits aménagés sur le gel, 5 μ l (10% du volume du produit de la RPC) de l'ADN amplifié sont déposés avec 1 μ l de tampon de chargement 6X (bleu de bromophénol 0,25%, xylène cyanol 0,25% et glycérol 30% dans l'eau). La migration a été faite sous un voltage constant (100 V) pendant 60 min. À la fin de la migration le gel a été immergé dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 μ g/ml) pour visualiser l'ADN amplifié en lumière ultraviolette (Foto UV 300 DNA Transilluminator 110 V, Fotodyne Inc., New Berlin, Wisconsin, USA). Le gel a été photographié sur film Polaroid de type 665.

3 TRANSFERT DE TYPE «SOUTHERN»

La méthode de transfert unidirectionnelle par capillarité décrite par Sambrook *et al.* (1989) a été utilisée en y apportant quelques modifications. Brièvement, le gel a été déposé dans une solution contenant du NaOH 0,5 N et NaCl 1 M pendant 15 minutes; cette opération a été répétée trois fois. Cette étape a permis la dénaturation de l'ADN. Le gel a ensuite été immergé dans le tampon de transfert soit le SSC 10X (SSC 20X: NaCl 3 M et citrate de sodium 0,3 M à pH 7,0). La solution de SSC a été changée 3 fois à intervalle de 15 min. Une membrane de nylon 66 Biotrans de 0,45 µm (ICN Biomedicals Inc., Irvine, Calif., USA), pré-trempée dans du SSC 10X, a été utilisée comme support solide.

4 PRÉPARATION DES SONDÉS

Des séquences oligonucléotidiques (3) dans le gène de la transcriptase inverse du VIH-1 ont été utilisées comme sondes moléculaires. Parmi celles-ci, deux nous ont été gracieusement fournies par le Dr. Sharon Cassol soit: la sonde SC67/70 située dans la région où se trouve deux des quatre mutations décrites par Larder et Kemp (1989) au niveau des acides aminés à la position 67 et 70 et la sonde SC215/219 chevauchant les deux autres mutations (acides aminés à la position 215 et 219) (figure 7). La troisième séquence (figure 7) a été synthétisée par le service de synthèse d'oligonucléotides de l'Institut Armand-Frappier (Laval, Québec, Canada). Cette séquence se situe dans une région plus conservée de la

transcriptase inverse du HIV-1 c'est-à-dire la région C (figure 3). Dans les trois cas un analogue de l'adénine, l'inosine, a été insérée aux endroits où une variation nucléotidique a été notée lors de l'alignement des séquences du HIV-1 répertoriées (GeneBank) à l'aide du programme Gene Works 2.0 (IntelliGenetics, Inc.).

Le marquage des sondes s'est effectué à l'extrémité 5' à l'aide de l'enzyme T4 polynucléotide kinase (T4PNK). Dans un microtube, 21,5 µl d'eau distillée, 4 µl de tampon de réaction 10X (Tris-HCl 500 mM à pH 7,6, MgCl₂ 100 mM, dithiothreitol 50 mM, spermidine 1 mM et EDTA 1 mM) et 1 µl de l'oligonucléotide à marquer (10 pmoles/µl) ont été mélangés. Ensuite 12,5 µl de gamma-³²P-ATP (4 500 Ci/mmol; 10 mCi/ml) et 1 µl de T4PNK (10 U/µl) (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, N.J., USA) ont été ajoutés et le tout incubé à 37°C pendant 30 minutes; après incubation, 7 µl de tampon de chargement 6X ont été ajoutés dans le tube et le tout chargé sur un gel de 10% acrylamide:bisacrylamide (29:1) dans le tampon TBE 1X (Tris-borate 89 mM et EDTA 2 mM) pour une migration de 40 minutes à 250 volts. À la fin de la migration, le gel recouvert de papier cellophane, a été mis en contact pendant 30 secondes avec un film Kodak X-Omat RP (Picker International, St-Laurent, Québec, Canada) dans une cassette à autoradiographie. Le film a été développé à l'aide d'un développeur automatique (X-Omat 20 processor, Kodak). La bande radioactive correspondant à la sonde oligonucléotidique a été localisée par superposition du film sur le gel et découpée. Le morceau de gel, déposé dans un microtube, a été trituré dans 125 µl de TNE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 100 mM et EDTA 1 mM) et incubé de

2 à 18 heures à 56°C. Après ce laps de temps le mélange a été transvidé dans une micro-unité filtrante de 0,45 µm (Nihon Millipore Kogyo K.K., Yonezawa, Japon) et centrifugé pendant 4 minutes à 12 000 x g. Les morceaux d'acrylamide, restés sur le filtre, ont été rincés avec 50 µl de TNE 1X et recentrifugés de nouveau. Après la dernière centrifugation le filtrat contenant la sonde radioactive a été conservé à -20°C. Le taux de radioactivité incorporé par µl de sonde a été mesuré à l'aide d'un compteur à scintillation Beckman. Dans un vial à scintillation 5 µl de la sonde ont été mélangés à 5 ml de liquide à scintillation (CytoScint (ICN)); le taux de radioactivité incorporé par µl de sonde a été déterminé.

Figure 7: Représentation schématique du fragment de 629 pb dans la RT avec les trois sondes oligonucléotidiques employées pour la technique d'hybridation.

La séquence pour chacune des sondes est représentée en caractères gras avec leur nom respectif.

RT-1

50 **SC67/70**

GGGCCTGATAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGIACIAAIT

100

GGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAA

150

TTAGGAATAACCACATCCCGCAGGGTTAAAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGT

200

250

GATGCATATTTTTTCAGTTCCTTAGATGAAGACTTCAGGAAGTATACTGCATTTACCATACT

300 **RTIC-1**

AGTATAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGT**ACAATGTGCTTCCACAGGGATGG**

350

AAAGGATCACCIGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATCTTAGAGCCTTTTAAAAAAC

400

AAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAAT

450

AGGGCAGCATAGAACA AAAAATAGAGGAGCTGAGACAACATCTGTTGAGGTGGGGACT**TTACCAI**

SC215/219

550

ACCIGATAAIAAACATCAGAAAGAACCTCCATTCTTTGGATGGGTATGAACTCCATCCTG

600

SC219R

ATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTGCTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACA

629

GAAITT

5 HYBRIDATION

5.1 Hybridation avec sondes oligonucléotidiques

La technique utilisée a été décrite par Meinkoth et Wahl (1984). La membrane de nylon qui a servi au transfert des ADN amplifiés a été incubée dans une solution de pré-hybridation (NaCl 900 mM, EDTA 6 mM, Tris-HCl 90 mM à pH 7,5, SDS 0,1% et ARNt 100 µg/ml) à 68°C durant 2 à 4 heures sous agitation. La sonde radioactive a été ajoutée directement à la solution de pré-hybridation soit 10^6 cpm de sonde par ml et le tout de nouveau incubé sous agitation à 42°C pendant 18 heures. La membrane a été par la suite lavée 3 fois dans du SSC 2X contenant 0,1% de SDS à 45°C, 3 fois dans du SSC 1X contenant 0,1% de SDS à 45°C et 3 fois dans du SSC 0,1X contenant 0,1% de SDS à température ambiante. Chaque lavage se faisait sous agitation constante et avait une durée de 10 min. La membrane a été séchée à l'air libre pendant quelques minutes pour être ensuite exposée sur un film Kodak X-Omat en présence d'un écran amplificateur pendant 2 à 18 heures.

5.2 Déshybridation des membranes

La technique de déshybridation permet la réhybridation des mêmes membranes avec d'autres sondes. Elle consiste à faire bouillir les membranes où sont fixées les sondes, dans une solution de SSC 2X et SDS 1% pendant 10 minutes. Les membranes sont ensuite réutilisées pour l'hybridation selon le protocole décrit dans la section 5.1.

6 CLONAGE

6.1 Purification des ADN amplifiés

Avant de procéder à l'étape du clonage, les ADN amplifiés ont été préalablement purifiés afin d'éliminer tout produit de dégradation ainsi que l'ADN matrice.

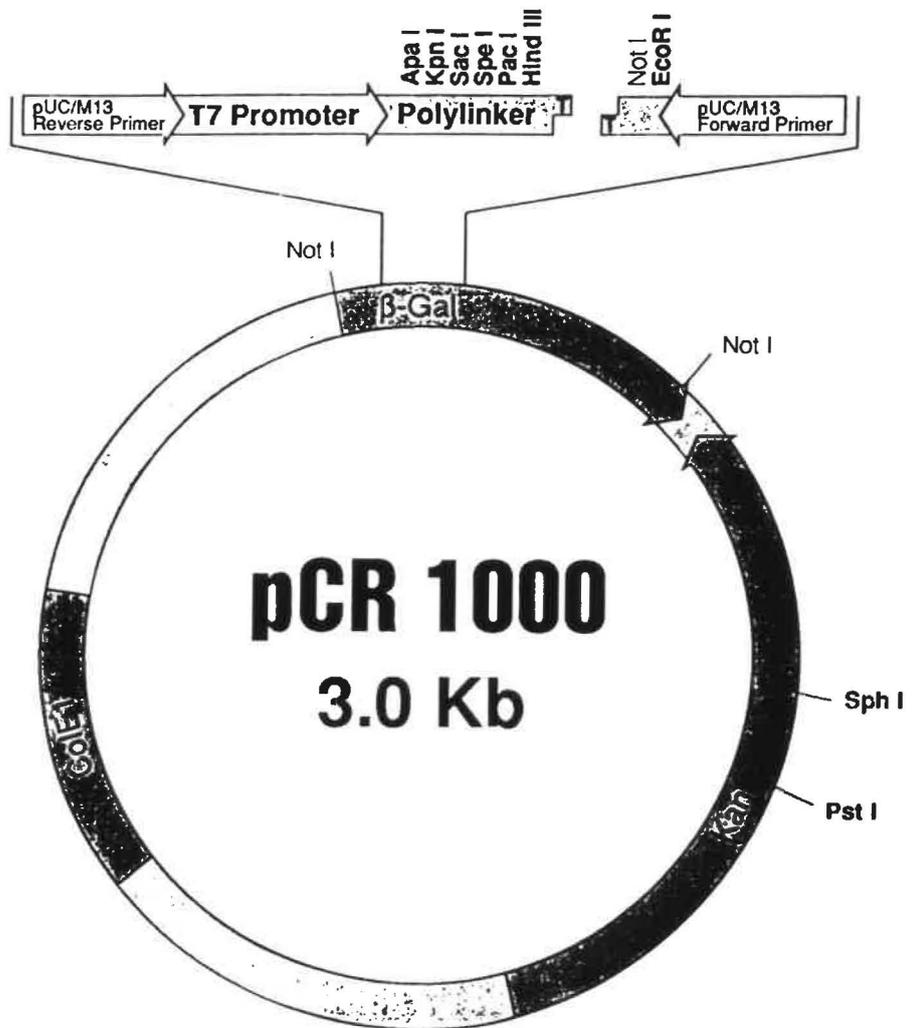
Suite à une électrophorèse en gel d'agarose 0,8%, le gel a été examiné après immersion dans le bromure d'éthidium à l'aide d'une lampe U.V. à ondes longues (366 nm) et la bande correspondant à la taille attendue a été découpée. L'élution de l'ADN s'est faite à l'aide de la trousse «Gene Clean» (Bio 101, La Jolla, Calif., USA) selon la méthodologie suggérée par le manufacturier. Cette technique est basée sur une simple adsorption des molécules d'ADN sur une matrice de silice en présence d'iodure de sodium.

6.2 Ligation et transformation

Le vecteur pCR1000 (Invitrogen corp., San Diego, Calif., USA) a été utilisé pour le clonage des ADN amplifiés (figure 8). Ce plasmide a été conçu spécialement pour l'insertion immédiate de l'ADN produit par RPC sans aucune modification. En effet, le plasmide déjà linéarisé contient aux extrémités 3' une déoxythymidine le rendant ainsi compatible à l'ADN obtenu par RPC. En effet les produits de la RPC sont pourvus aux extrémités 3' d'une déoxyadénosine (Clark, 1988).

La ligation et la transformation se sont effectuées à l'aide d'une trousse de clonage (Invitrogen) comprenant tous les réactifs nécessaires à cette méthodologie. Dans un microtube, 2 μ l du vecteur pCR1000 (25 ng/ μ l), 1 μ l de tampon de ligation 10X, 1 μ l d'ADN amplifié et élué (20 ng/ μ l), 1 μ l de T4 DNA ligase (4 U/ μ l) et 6 μ l d'eau distillée ont été mélangés. Le mélange de ligation a été incubé à 12°C pendant 18 heures avant d'être utilisé pour la transformation de 50 μ l de cellules compétentes *E. coli* INVaF' (Invitrogen). Par la suite les cellules bactériennes ont été étalées sur des géloses de milieu LB (extrait de levure 0,5%, bacto-tryptone 1%, NaCl 1% et bacto-agar 1,5%) contenant 50 μ g/ml de kanamycine et 40 μ g/ml de X-Gal pour permettre la sélection des bactéries transformées par les plasmides recombinants. Après une incubation à 37°C durant la nuit, les colonies recombinantes, sélectionnées par leur couleur blanche, ont été repiquées et conservées à 4°C jusqu'à leur identification.

Figure 8: Vecteur de clonage pCR1000 avec les sites de restriction de *NotI*.



7 DÉTECTION DES COLONIES RECOMBINANTES

7.1 Transfert des colonies sur filtre

La technique de transfert des colonies a été utilisée comme moyen d'identification des clones contenant les ADN amplifiés. La méthodologie utilisée est celle décrite par Sambrook *et al.* (1989) avec des modifications mineures. Brièvement, un papier filtre Whatman 541 a été appliqué directement sur les géloses contenant les colonies bactériennes. Le papier filtre a ensuite été retiré ce qui a entraîné les colonies. La lyse bactérienne s'est effectuée en déposant les papiers filtres sur un coussin imbibé d'une solution de NaOH 0,5 N et ensuite neutralisés sur un coussin imbibé d'une solution de Tris-HCl 1 M à pH 7,4. Enfin, la fixation de l'ADN a été effectuée sur un coussin imbibé d'une solution de Tris-HCl 0,5 M à pH 7,0 et NaCl 3 M. Chacune de ces étapes comportait des temps d'incubation de 10 minutes et ont été répétées deux fois. Les papiers ont été séchés dans un four à vide à 80°C pendant 60 minutes.

7.2 Hybridation des colonies sur filtre

L'oligonucléotide RTC-1 a été utilisé comme sonde moléculaire dans la détection des colonies bactériennes possédant les plasmides recombinants. Le marquage s'est effectué selon la technique décrite dans la section 4.

La méthodologie exposée dans la section 5 a été employée pour l'hybridation, les lavages et l'exposition des filtres.

7.3 Minipréparation des colonies positives à l'hybridation

Les colonies bactériennes ont étéensemencées dans 3 ml de milieu LB en présence de kanamycine (50 µg/ml). Après une nuit à 37°C, les bactéries ont été centrifugées à 12 000 x g pendant 4 minutes et le culot resuspendu dans 120 µl d'une solution contenant 50 mM de glucose, 10 mM EDTA et 25 mM de Tris-HCl à pH 8,0. La lyse bactérienne s'est effectuée en présence de 240 µl d'une solution de NaOH 0,2 N et de SDS 1% et la suspension a été mélangée par inversion (3 à 4 fois) avant de déposer les tubes sur glace pendant 10 minutes. Par la suite, 180 µl d'une solution 3 M d'acétate de potassium à pH 4,8 ont été ajoutés au lysat bactérien, mélangés légèrement au vortex et incubés pendant 10 minutes sur glace. Après l'incubation, les tubes ont été centrifugés à 12 000 x g pendant 10 minutes et chaque surnageant a été précipité à l'aide de 2 volumes d'éthanol 100% et conservé à -20°C pendant 30 minutes. Les plasmides précipités ont été centrifugés pendant 20 minutes à 12 000 x g et les culots séchés sous vide (Speed Vac Concentrator, Savant Instrument Inc., Hicksville, New York, USA). Les culots ont été resuspendus dans 50 µl d'eau distillée contenant 20 µg/ml de ribonucléase.

7.4 Digestion par endonucléase de restriction

Après extraction des plasmides recombinants, ces derniers ont été clivés par l'endonucléase de restriction *Not* I (Pharmacia) pour générer 3 fragments dont un de 974 pb comprenant le fragment d'ADN amplifié. La réaction a été effectuée

dans un volume final de 15 μ l comprenant 5 μ l de plasmide recombinant, 3 μ l de tampon de réaction 10X (100 mM de Tris-acétate à pH 7,5, 100 mM d'acétate de magnésium et 500 mM d'acétate de potassium), 0,5 μ l de triton X-100 à 0,3% et 0,5 μ l d'enzyme (20 U/ μ l). Le tout a été incubé à 37°C pendant 90 minutes.

8 SÉQUENÇAGE

8.1 Purification des plasmides recombinants

Les clones positifs par hybridation et générant un fragment de 974 pb après clivage, ont été réensemencés de nouveau dans 3 ml de LB en vue d'être purifiés pour le séquençage.

Après une nuit à 37°C les plasmides recombinants ont été purifiés à l'aide de la trousse de purification d'ADN «Magic Minipreps» (Promega, Madison, USA). Ce système utilise le même principe que la technique standard des minipréparations. L'avantage se situe au niveau de la vitesse d'exécution (moins de 15 minutes) et de la pureté complète du matériel grâce à une mini-colonne à base de silicone. Les instructions incluses dans la trousse ont été utilisées.

8.2 Réaction de séquençage

Suite à la purification des plasmides, la moitié du volume a été utilisée pour la réaction de séquençage, service offert à l'Institut Armand-Frappier.

Brièvement, le plasmide à séquencer a été préalablement dénaturé en présence de NaOH 0,2 N pour permettre l'appariement de l'amorce «reverse M13» lors de la synthèse du brin positif ou l'amorce «forward M13» pour la synthèse du brin négatif.

La polymérisation a ensuite été initiée en présence de la T7 DNA polymérase (3 U/ μ l), de trois déoxynucléotides (dCTP, dTTP et dGTP) et ^{35}S -dATP pendant 5 minutes à 37°C. Par la suite, le mélange réactionnel a été réparti dans quatre tubes contenant un des didéoxynucléotides (ddATP, ddTTP, ddCTP ou ddGTP) afin d'interrompre la synthèse du brin lors de l'incorporation d'un des didéoxynucléotides.

Le contenu de chaque tube a été déposé dans un puits aménagé sur un gel de 4% de polyacrylamide:bisacrylamide (19:1) qui contenait 7 M d'urée, dans le tampon TBE 1X. Après migration, le gel a été fixé dans une solution de 10% de méthanol et d'acide acétique et séché. Un film X-Omat de Kodak a été appliqué sur le gel et développé après contact de 24 à 72 heures.

8.3 Analyse des séquences

Les séquences obtenues ont été analysées à l'aide du programme Gene Works 2.0 (IntelliGenetics, Inc.). Pour un même échantillon clinique les séquences de différents plasmides recombinants ont été comparées entre elles et ensuite avec la séquence de référence du VIH-1 (HIVBRU).

RÉSULTATS

1 AMPLIFICATION DES ÉCHANTILLONS CLINIQUES

La première étape de ce projet consistait à amplifier une région précise de la RT du VIH-1 à partir d'ADN extrait de lymphocytes. Ces cellules provenaient de patients séropositifs pour le VIH-1 dont certains d'entre eux étaient sous traitement à l'AZT. Des prélèvements sanguins ont été effectués au cours du traitement. Le tableau 1 résume les données disponibles pour chaque échantillon reçu.

Les produits obtenus à la suite de la double amplification sont représentés dans les figures 9 et 10 avec les témoins négatifs et le témoin positif après électrophorèse en gel d'agarose 0,8%. Le fragment de 629 pb attendu d'après les amorces utilisées, est présent pour chaque échantillon amplifié.

2 HYBRIDATION

2.1 Dans une région conservée du gène *pol* (sonde RTC-1)

Afin de confirmer l'origine des produits amplifiés, la sonde radiomarquée RTC-1 a été utilisée (figure 7). Cette sonde correspond à une région conservée de la RT (région C). Les produits amplifiés ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose et par la suite transférés sur une membrane de nylon. Les figures 11C et 12C représentent les autoradiographies obtenues après hybridation avec la sonde RTC-1. Pour tous les produits amplifiés la sonde a reconnu la région C de la RT (figure 3). On constate qu'il y a une variation dans la réponse obtenue plus particulièrement pour les échantillons 348, 225-6 et 108-4 (figure 12C puits 4,

5 et 10) ou les signaux sont beaucoup plus faibles. Cette variation dans le signal peut être causée par une quantité moindre d'ADN.

2.2 Dans une région variable du gène *pol* (sonde SC67/70)

La sonde SC67/70 (figure 7) qui correspond à une des deux régions de la RT susceptible de subir des variations dans la séquence nucléotidique a été utilisée pour la suite de nos travaux. Ainsi, il a été possible de vérifier la présence éventuelle de mutations dans les fragments d'ADN amplifiés des échantillons cliniques.

Les membranes ont été déshybridées et ensuite hybridées de nouveau avec la sonde radiomarquée SC67/70. Les autoradiographies de ces membranes sont reproduites aux figures 11B et 12B. Dans les deux cas, l'hybridation avec la sonde SC67/70 a donné une plus grande hétérogénéité dans le signal émis. À la figure 11B, il est possible de constater que pour un même patient, le 024, le signal émis varie selon le moment où le prélèvement a été effectué pendant le traitement à l'AZT (puits 1 à 5) et ce, pour une intensité similaire des fragments visualisés après électrophorèse en gel d'agarose (figure 11A, puits 1 à 5). Pour le patient 041 (figure 11B, puits 11 et 12), le signal est également plus faible. Cette baisse dans le signal peut s'expliquer par une quantité moindre d'ADN. Dans la figure 12B certains échantillons se sont avérés négatifs (puits 3 et 10) alors que pour d'autres un signal très faible est émis (puits 4, 5, 6 et 11) et ce, après plus de 60 heures d'exposition.

2.3 Dans une région variable du gène *pol* (sonde SC215/219)

La troisième sonde utilisée, la SC215/219 (figure 7), correspond à la seconde région qui semble être impliquée à la résistance à l'AZT.

Les figures 11D et 12D représentent les autoradiographies des membranes après hybridation avec cette sonde. Les résultats des deux figures ressemblent à ceux obtenus en hybridation avec la sonde RTC-1. Le signal est similaire dans l'ensemble des échantillons à l'exception de l'échantillon 063 (figure 12D puits 3) où le signal est de beaucoup plus faible. Ceci laisse supposer qu'il pourrait avoir un changement dans la séquence nucléotidique et que seulement une partie de cette région est reconnue par la sonde au cours de l'hybridation.

3 CLONAGE

Après avoir confirmé la validité des produits amplifiés, la seconde étape consistait à cloner ces fragments d'ADN en vue de les séquencer.

Une banque des fragments de 629 pb a été constituée en utilisant le vecteur pCR1000. Les recombinants ont été sélectionnés à l'aide de la sonde RTC-1 par la méthode d'hybridation des colonies. Environ 15 à 20% des colonies se sont avérées positives pour chaque fragment cloné. À la suite d'une minipréparation, ces recombinants positifs ont été clivés par *Not* 1 et une électrophorèse en gel d'agarose a été effectuée. Ce clivage devrait libérer entre autres une insertion de 974 pb, composé du fragment de 629 pb et d'une partie du vecteur (345 pb).

La figure 13 représente quelques-uns de ces clones avant et après clivage. Les recombinants situés dans les puits 3, 5, 6, 11 et 14 contiennent l'insertion attendue de 974 pb. Donc, seuls les recombinants présentant ce profil électrophorétique ont été séquencés.

4 SÉQUENÇAGE

Pour chaque échantillon clinique amplifié et cloné, une moyenne de huit clones recombinants a été séquencée. Toutes les séquences d'un même échantillon ont été comparées entre elles ainsi qu'avec la séquence de la RT du HIVBRU, utilisée comme souche de référence.

À titre d'exemple, la séquence complète, en nucléotides et en acides aminés, des fragments amplifiés pour le patient 024 est comparée à la séquence de la souche de référence (figure 14A-B-C). Sur les 629 nucléotides séquencés, 42 (024-2), 21 (024-5) et 42 nucléotides (024-7) différents ont été relevés. Sur ces variations seulement 14, 9 et 14 acides aminés ont respectivement subi une modification au niveau du codon. Ces changements sont rapportés dans le tableau 2. Le tableau indique le numéro de l'acide aminé substitué pour chaque échantillon du patient 024 ainsi que la région dans la RT où ces substitutions sont observées.

Les substitutions situées au niveau des acides aminés 67, 70, 91, 135, 136, 166 et 215 (c'est-à-dire moins de la moitié) sont absentes chez toutes les

souches de VIH-1 répertoriées (GeneBank), alors que pour les autres on a retrouvé une très grande variabilité pour ces mêmes souches.

Après 28 semaines de traitement, la population de VIH-1 chez ce patient (024) est beaucoup plus hétérogène puisqu'il y a mélange du type non mutant (sauvage) et mutant pour un même acide aminé. Ceci semble se stabiliser avec la durée du traitement (40 et 66 semaines). Un traitement prolongé (66 semaines) a entraîné l'apparition de substitutions aux acides aminés à la position 67 et 215 dans l'échantillon 024-7. De plus, les substitutions aux positions 70 et 166, présentes à 28 semaines de traitement, disparaissent temporairement pour réapparaître à 66 semaines. La majorité de ces substitutions se retrouvent dans les régions variables de la RT (figure 3).

Les échantillons 025-1 et 025-2, amplifiés et clonés, ont été séquencés. Les substitutions présentes sont rapportées dans le tableau 3. Une très grande homogénéité dans la souche virale du patient est observée.

Un troisième échantillon, le 320-5, a été séquencé; les résultats sont compilés dans le tableau 4. Dans la séquence, des substitutions ont été relevées au niveau de cinq résidus acides aminés dont deux sont absentes chez les souches de VIH-1 disponibles. Ces résidus sont à la position 135 et 215. La thréonine située à la position 215 a été remplacée par une tyrosine; ce changement a également été retrouvé dans l'échantillon 024-7. Dans les deux cas, ces patients (320 et 024) étaient sous traitement depuis plus de six mois.

Tableau 1: Compilation des données se rapportant aux échantillons cliniques.

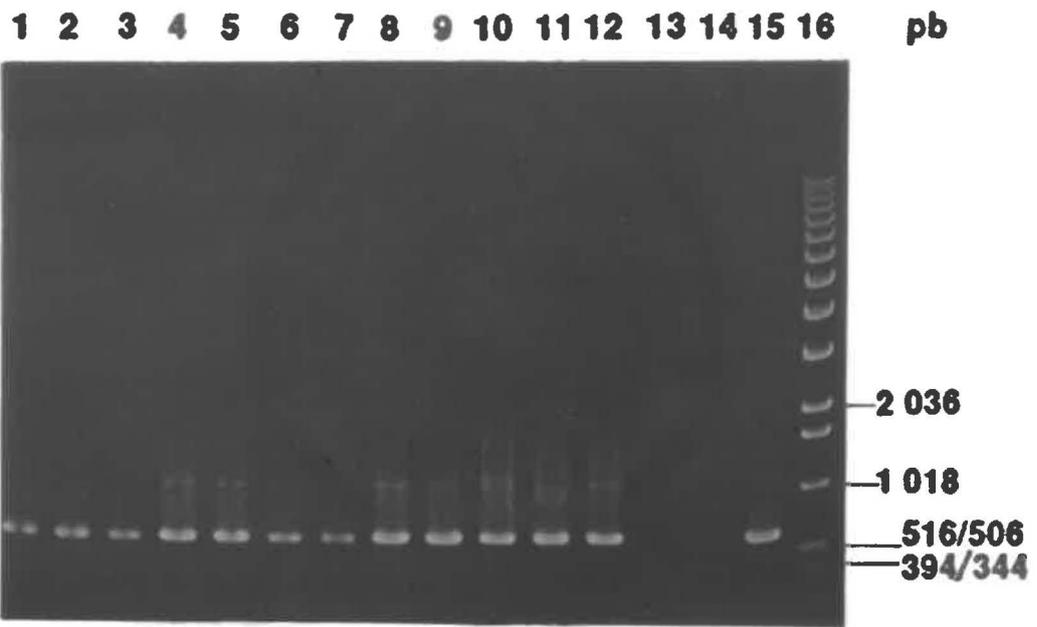
Patient (début du traitement)	Numéro de l'échantillon (date du prélèvement)				
003 (90-01-10)	-8 (90-12-20)				
004 (91-01-07)	-3 (90-12-19)				
024 (89-05-31)	-2 (89-12-05)	-3 (90-01-09)	-5 (90-03-07)	-6 (90-04-10)	-7 (90-09-12)
025 (90-08-15)	-0 (89-12-12)		-1 (90-04-04)	-2 (90-08-29)	
028 (90-04-10)	-0 (90-03-21)		-1 (90-04-10)		
041 ∅	-1 (90-02-20)		-2 (90-08-01)		
047 (89-12-13)	-6 (90-12-19)				
063 ND	-5 ND				
108 ND	-4 ND				
117 (90-11-27)	-1 (90-12-19)				
225 ND	-6 ND				
235 (90-01-10)	-5 (90-12-19)				
320 (90-03-21)	-5 (90-12-19)				
323 (90-03-20)	-5 (90-12-19)				
339 ND	-2 ND				
348 ND	∅				

∅ Ne s'applique pas.

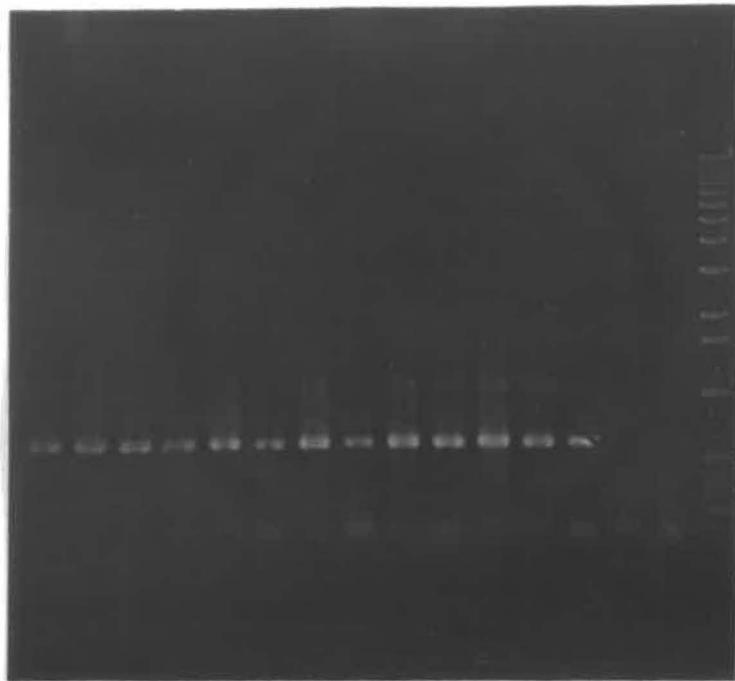
ND Non disponible.

Figure 9: Visualisation après électrophorèse en gel d'agarose 0,8% des fragments d'ADN de 629 pb obtenus après amplification.

Puits:	1: échantillon 025-0	9: échantillon 024-3
	2: échantillon 025-1	10: échantillon 024-5
	3: échantillon 025-2	11: échantillon 024-6
	4: échantillon 028-1	12: échantillon 024-7
	5: échantillon 028-2	13: témoin négatif
	6: échantillon 041-1	14: témoin sans ADN
	7: échantillon 041-2	15: témoin positif
	8: échantillon 024-2	16: marqueur de taille



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 pb



— 1 635
— 1 018
— 516/506
— 344

Figure 11: Autoradiographies obtenues après hybridation avec différentes sondes.

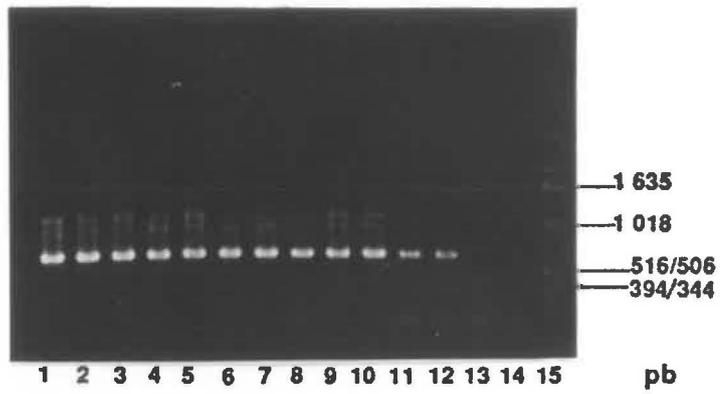
A) fragments d'ADN amplifiés de 629 pb en gel d'agarose avant transfert sur membrane de nylon.

B) autoradiographie de la membrane de nylon après hybridation avec la sonde SC67/70.

C) autoradiographie de la membrane de nylon après hybridation avec la sonde RTC-1.

D) autoradiographie de la membrane de nylon après hybridation avec la sonde SC215/219.

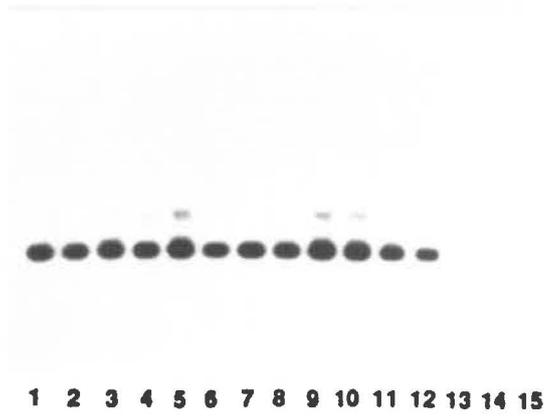
Puits:	1: échantillon 024-2	9: échantillon 028-0
	2: échantillon 024-3	10: échantillon 028-1
	3: échantillon 024-5	11: échantillon 041-1
	4: échantillon 024-6	12: échantillon 041-2
	5: échantillon 024-7	13: témoin négatif
	6: échantillon 025-0	14: témoin sans ADN
	7: échantillon 025-1	15: marqueur de taille
	8: échantillon 025-2	



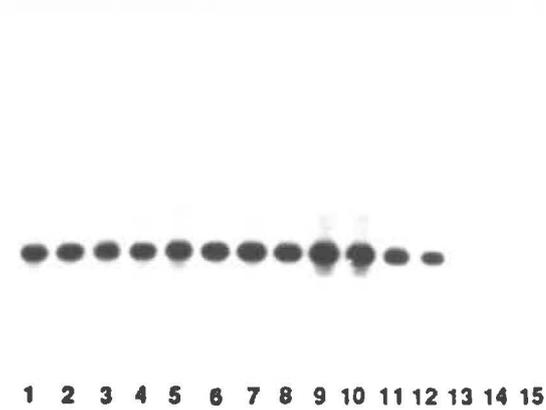
A



B



C



D

Figure 12: Autoradiographies obtenues après hybridation avec différentes sondes.

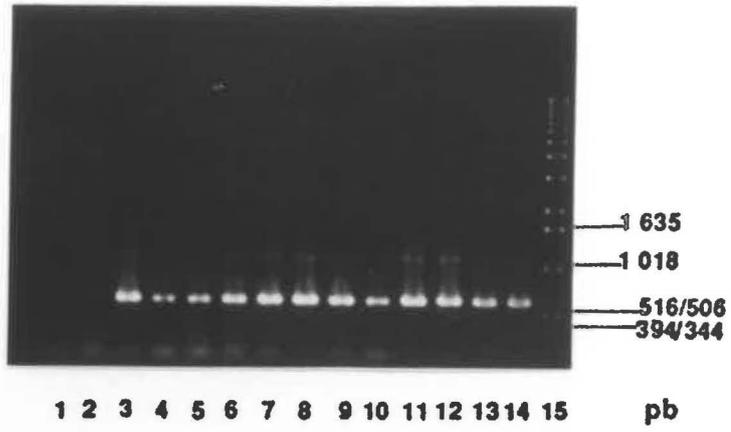
A) fragments d'ADN amplifiés de 629 pb en gel d'agarose avant transfert sur membrane de nylon.

B) autoradiographie de la membrane de nylon après hybridation avec la sonde SC67/70.

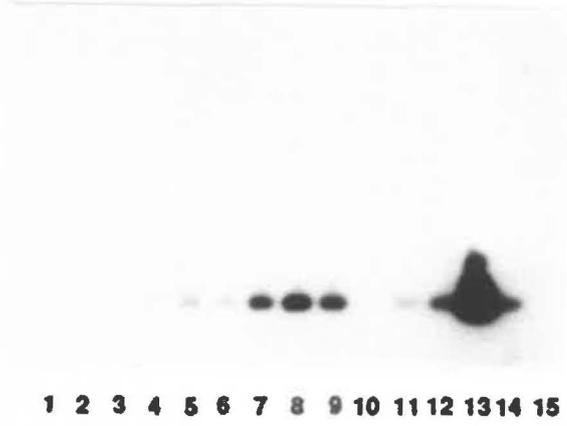
C) autoradiographie de la membrane de nylon après hybridation avec la sonde RTC-1.

D) autoradiographie de la membrane de nylon après hybridation avec la sonde SC215/219.

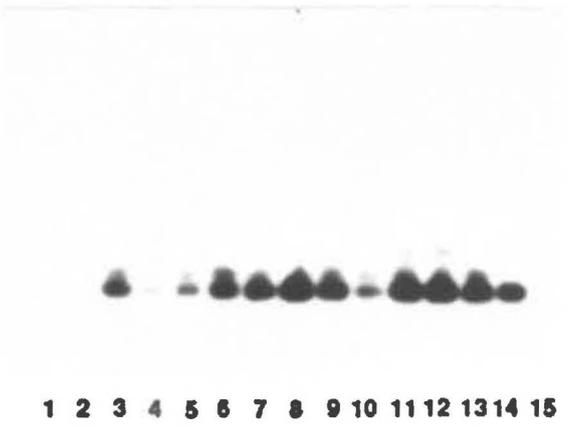
Puits:	1: témoin négatif	9: échantillon 320-5
	2: témoin sans ADN	10: échantillon 108-4
	3: échantillon 063-5	11: échantillon 235-5
	4: échantillon 348	12: échantillon 323-5
	5: échantillon 225-6	13: échantillon 117-1
	6: échantillon 047-6	14: échantillon 003-8
	7: échantillon 339-2	15: marqueur de taille
	8: échantillon 004-3	



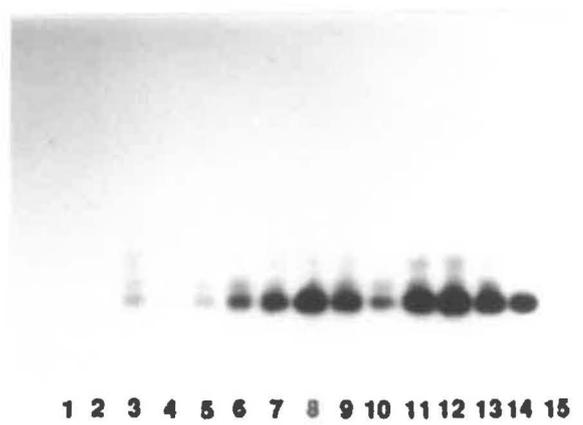
A



B



C



D

Figure 13: Excision des insertions de 974 pb par *Not* 1 de quelques clones recombinants de la série des produits amplifiés provenant des échantillons 024.

Puits:

- 1: marqueur de taille
- 2: clone 024-2-33 non clivé
- 3: clone 024-2-33 clivé
- 4: clone 024-2-36 non clivé
- 5: clone 024-2-36 clivé
- 6: clone 024-3-70 clivé
- 7: marqueur de taille
- 8: plasmide pCR1000 non clivé
- 9: plasmide pCR1000 clivé
- 10: clone 024-3-88 non clivé
- 11: clone 024-3-88 clivé
- 12: clone 024-7-12 non clivé
- 13: clone 024-7-12 clivé
- 14: clone 024-7-96 clivé

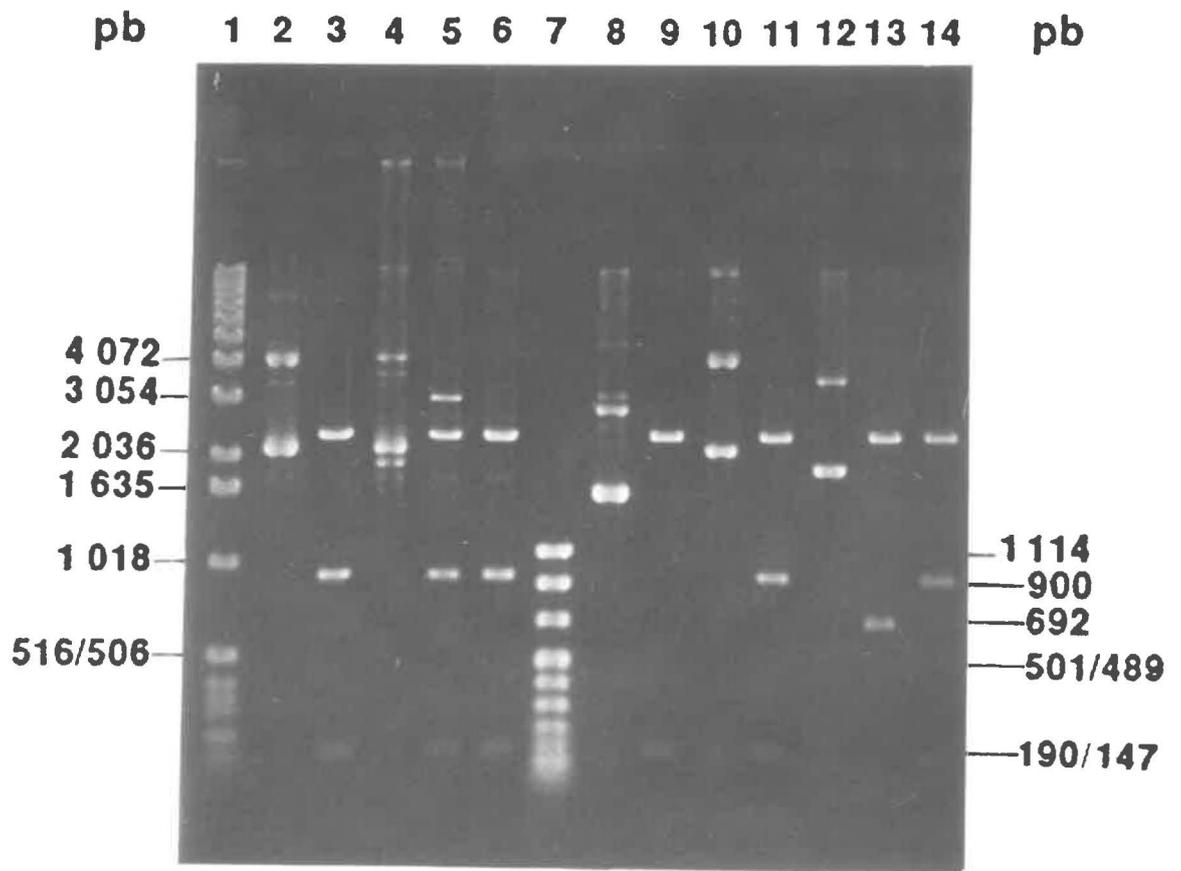


Figure 14: Comparaison des séquences des fragments d'ADN amplifiés provenant du patient 024 à différents temps de traitement à l'AZT avec la séquence de la souche HIVBRU utilisée comme référence.

A: séquence HIVBRU versus séquence 024-2 (28 sem)

B: séquence HIVBRU versus séquence 024-5 (40 sem)

C: séquence HIVBRU versus séquence 024-7 (66 sem)

La séquence nucléotidique de la référence est présentée sous forme de triplet avec l'acide aminé correspondant. Les tirets indiquent qu'il y a homologie de séquence de l'échantillon avec celle de la référence et les lettres signalent qu'une variation est retrouvée dans les fragments amplifiés. Les chiffres indiquent la position des acides aminés dans la RT.

Tableau 2: Comparaison des substitutions des acides aminés retrouvés dans le fragment amplifié de la RT du VIH-1 provenant du patient 024 sous traitement à l'AZT avec une souche de référence (HIVBRU).

No. a.a.	Souche référence	024-2 28 sem†	024-5 40 sem†	024-7 66 sem†	Région dans la RT
67*	Asp	Asp	Asp	Asn/Asp°	A-B
70*	Lys	Arg/Lys°	Lys	Arg	A-B
83	Arg	Arg	Lys	Arg	A-B
91*	Gln	Gln	Gln/Arg°	Gln	A-B
122	Glu	Lys	Lys	Lys	B-C
123	Asp	Glu	Asp	Glu	B-C
135*	Ile	Ile/Val°	Ile	Ile	B-C
136*	Asn	Asn	Ser	Asn	B-C
162	Ser	Ser/Cys°	Tyr	Cys/Ser°	C-D
166*	Lys	Lys/Arg°	Lys	Lys/Arg°	C-D
169*	Glu	Glu/Asp°	Gly	Glu	D
177	Asp	Glu	Asp	Glu	D-E
178	Ile	Met/Leu°	Ile	Ile/Met°	D-E
200	Thr	Ala	Ala	Ala	E-F
207	Gln	Glu	Gln	Glu	E-F
214	Leu	Phe	Phe	Phe	E-F
215*	Thr	Thr	Thr	Tyr	E-F
245	Val	Met	Val	Met	E-F
259	Lys	Asn	Asn	Asn	F

* Acides aminés dont les substitutions sont absentes dans toutes les souches de VIH-1 répertoriées.

† Nombre de semaines sous traitement à l'AZT au moment du prélèvement.

° Présence d'une population mixte d'acides aminés.

Tableau 3: Comparaison des substitutions des acides aminés retrouvés dans le fragment amplifié de la RT du VIH-1 provenant du patient 025 sous traitement à l'AZT avec une souche de référence (HIVBRU).

No. a.a.	Souche référence	025-1 témoin	025-2 2 sem†	Région dans la RT
83	Arg	Lys	Lys	A-B
122	Glu	Lys	Lys	B-C
162	Ser	Tyr	Tyr	C-D
200	Thr	Ala	Ala	E-F
214	Leu	Phe	Phe	E-F
259	Lys	Asn	Asn	F

Tableau 4: Comparaison des substitutions des acides aminés retrouvés dans le fragment amplifié de la RT du VIH-1 provenant du patient 320 sous traitement à l'AZT avec une souche de référence (HIVBRU).

No. a.a.	Souche référence	320-5 43 sem†	Région dans la RT
122	Glu	Pro	B-C
135*	Ile	Thr	B-C
214	Leu	Phe	E-F
215*	Thr	Tyr	E-F
259	Lys	Asn	F

* Acides aminés dont les substitutions sont absentes dans toutes les souches de VIH-1 répertoriées.

† Nombre de semaines sous traitement à l'AZT au moment du prélèvement.

DISCUSSION

L'emploi de la RPC par une double réaction d'amplification, s'est avéré efficace pour amplifier une partie du génome du VIH-1 localisée plus précisément dans la région codante pour la RT, et ce, en partant directement des lymphocytes de patients sous traitement à l'AZT. De plus, l'amplification directe d'une séquence du génome viral provenant de ces échantillons, permet de conserver toutes les populations virales éventuellement présentes chez l'individu. Par ailleurs, si les isolats sont préalablement cultivés en présence d'antiviraux en culture cellulaire, une sélection de souches virales résistantes à l'antiviral utilisé pourrait survenir au détriment des autres sous populations.

Les fragments correspondant à la taille attendue, obtenus par PCR et présents que dans les échantillons provenant de patients séropositifs, ont vu leur origine confirmée à l'aide d'une sonde moléculaire spécifique pour tous les sous types du VIH 1 répertoriés. Ainsi, la mise au point de cette sonde, identifiée RTC-1 et reconnaissant une région conservée dans la RT, nous a permis de confirmer que nous étions bien en présence des fragments d'ADN proviral du VIH-1 (figures 11C et 12C).

L'utilisation subséquente des sondes SC67/70 et SC215/219 dans le cadre d'une hybridation de type «Southern», nous a suggéré des variations au niveau de la séquence nucléotidique pour certains échantillons (figures 11B et 12B). Ces variations sont plus particulièrement situées dans la région reconnue par la sonde SC67/70, chevauchant deux des quatre mutations impliquées dans l'apparition de phénomènes de résistance à l'AZT (Larder et Kemp, 1989). Cette approche

méthodologique pourrait éventuellement, à titre indicatif, être appliquée dans l'étude de populations de VIH-1 résistantes à l'AZT sans recourir au séquençage. Ceci permettrait un meilleur suivi de l'évolution des populations virales chez les individus séropositifs au cours des différents traitements par des antiviraux. Cependant, il faudrait vérifier avec un échantillonnage plus important le tableau clinique et la cinétique d'apparition de ces mutations principales (acides aminés 41, 67, 70, 215, 219) (Larder et Kemp, 1989; Kellam *et al.*, 1992) ainsi que d'autres, n'ayant pas encore été répertoriées.

Une autre approche permettant de vérifier la cinétique d'apparition des souches de VIH résistantes à l'AZT a été développée (Boucher *et al.*, 1990; Larder *et al.*, 1991b). Elle consiste en l'utilisation de deux RPC successives. La première permet l'amplification, à l'aide d'amorces universelles, d'une partie du gène de la RT incluant la mutation à être analysée. La seconde RPC permet de distinguer les souches virales mutantes des souches sauvages. Pour ce faire, une des amorces universelles est utilisée en combinaison soit avec une amorce reconnaissant le type mutant, soit avec une autre s'appariant au type sauvage. Ainsi, il est possible de distinguer les populations sauvages ou mutantes prédominantes (résistance à l'AZT) des populations mixtes. Cette approche, contrairement à la nôtre, ne permet pas la mise en évidence simultanée de plusieurs mutations.

L'analyse des séquences nucléotidiques chez le patient 024 a démontré la présence de trois mutations impliquées dans la résistance à l'AZT soit au niveau

des acides aminés 67, 70 et 215 (Larder et Kemp, 1989). De plus, la comparaison des séquences obtenues à différentes périodes du traitement démontre une apparition temporelle de ces mutations. L'ordre d'apparition de celles-ci va de pair avec ce qui a été rapporté (Boucher *et al.*, 1992). En effet, les auteurs ont décrit un ordre d'apparition des quatre mutations impliquées dans le développement de la résistance du VIH-1 face à l'AZT.

La première substitution à paraître est située au résidu 70 (changement de la Lys pour une Arg) et elle est transitoire. Par la suite, une substitution à la position 215 (changement d'une Thr pour une Phe ou Tyr) peut survenir (tableau 2). À mesure que le traitement progresse, il y a réapparition de la substitution au résidu 70. Celles localisées aux positions 67 (remplacement de l'Asp par une Asn) et 219 (Lys remplacée par une Gln) ne surgissent que beaucoup plus tard puisque celles-ci sont associées au phénotype le plus résistant (Boucher *et al.*, 1992). La souche virale isolée chez ce patient (024) est composée d'une population mixte de sauvages et de mutants (aux positions 67 et 70) confirmant effectivement une évolution vers un phénotype résistant à l'AZT. L'absence de substitution au résidu 219 peut s'expliquer par le fait qu'un changement à cette position associée aux trois autres, favorise l'apparition d'une souche virale dont la sensibilité face à l'AZT est fortement diminuée; donc ce changement n'apparaît que beaucoup plus tard dans le traitement (Boucher *et al.*, 1992).

L'analyse de nouveaux échantillons (024) obtenus à la suite du traitement (plus de 66 semaines) nous permettra de vérifier ces données.

Une cinquième substitution, associée à la résistance à l'AZT, a été récemment rapportée (Kellam *et al.*, 1992). Il s'agit de l'acide aminé Met⁴¹ remplacé par une Leu. Cette dernière substitution n'a pu être observée puisque la série d'amorces utilisées lors de la seconde RPC englobaient les acides aminés de la position 51 à 259 inclusivement. Par contre les produits de la première RPC incluent l'acide aminé 41, il pourra donc être possible d'effectuer une seconde RPC en utilisant d'autres amorces.

L'acide aminé 135 a également été rapporté comme étant impliqué dans le développement de souches de VIH-1 résistantes à l'AZT (Gao *et al.*, 1992). Les auteurs ont isolé (dans un isolat clinique ainsi que dans une souche de laboratoire), après passage en culture cellulaire en présence de la drogue, des souches résistantes à l'AZT. L'acide aminé Ile¹³⁵ a été remplacé soit par une Val ou une Thr. Dans notre cas, le 024, Ile¹³⁵ a été remplacée de façon transitoire par une Val après 28 semaines de traitement. De plus, on y retrouve une population mixte du type sauvage et mutant. Le fait que l'analyse des séquences ait été effectuée directement à partir de cellules mononucléées sans passage préalable en culture cellulaire, peut expliquer la double population. De plus, cette substitution transitoire est susceptible de réapparaître plus tard dans le traitement. L'avantage d'effectuer directement une analyse des séquences à partir des isolats permet d'identifier les populations de VIH hétérogènes présentes chez l'individu, ce qui n'est pas possible lors d'un passage des isolats en culture cellulaire en présence de la drogue pouvant contribuer à la sélection de sous populations résistantes.

L'analyse de l'isolat du patient 024 obtenu avant le début de la thérapie, nous indiquera si toutes ces mutations étaient déjà présentes ou si elles sont imputables au traitement.

Les résultats d'analyses obtenus pour le patient 025 permettent de constater la présence d'une population homogène de virus avant le traitement. Par ailleurs, dû au nombre limité d'échantillons, nous ne pouvons conclure quant à l'impact du traitement sur la souche virale; seule l'analyse de nouveaux isolats permettra de vérifier les effets de l'AZT sur ceux-ci.

Un troisième cas a été analysé, il s'agit du patient 320. On remarque la présence de substitutions aux positions 135 (Ile remplacée par une Thr) et 215 (Thr remplacée par une Tyr) après 43 semaines de traitement à l'AZT. Comme mentionné dans la littérature, ces changements semblent être respectivement associés à la résistance à l'AZT (Gao et al., 1992) ainsi qu'à une résistance partielle à cette drogue (Boucher et al., 1992). Néanmoins, l'analyse d'un échantillon avant le traitement est nécessaire pour la confirmation de ces substitutions.

Il est à noter que les mutations ci-haut mentionnées et confirmées par la littérature, ont fait l'objet d'études quant à leur impact sur la RT du VIH-1 (Boyer et al., 1992a, 1992b). Dans tous les cas, ces substitutions n'ont pas altéré l'activité polymérase de la RT, suggérant que celles-ci ne se retrouvent pas dans le site actif de la polymérase.

Depuis l'établissement de la structure tridimensionnelle de la RT du VIH-1 (Kohlstaedt et al., 1992), il a été possible de localiser les résidus impliqués dans la résistance de l'AZT. D'après leur position, ils semblent être impliqués dans l'attachement de la matrice à l'enzyme.

CONCLUSION

L'utilisation d'une double RPC s'est montrée efficace pour l'amplification d'une région de la RT et ce, directement à partir de lymphocytes humains. Cette approche nous évite de passer les isolats en culture cellulaire et aussi de favoriser une souche virale au détriment des autres. De plus, la RPC s'est montrée très spécifique et reproductible quant à l'amplification de tous les isolats obtenus. Ceci a été confirmé par hybridation avec une sonde oligonucléotidique (RTC-1).

La présence de substitutions au niveau de certains acides aminés (échantillons 024 et 320) appuie l'idée que des mutations dans le gène *pol* pouvaient être impliquées dans l'apparition de souches de VIH-1 résistantes à l'AZT. De plus, plusieurs de ces variations avaient déjà été rapportées dans la littérature.

L'apparition *in vivo* de souches moins sensibles à l'AZT ne signifie pas nécessairement une détérioration de l'état général du patient. Cependant, le fait de pouvoir mettre en évidence ces souches résistantes chez un patient sous traitement à l'AZT, peut être une bonne indication pour la mise en place de nouvelles thérapies favorisant l'utilisation combinée d'antiviraux pour le traitement des individus porteurs du VIH.

BIBLIOGRAPHIE

- AHMAD, N. et S. VENKATESAN. 1988. *Nef* protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* 241: 1481-1485.
- ARGOS, P. 1988. A sequence motif in many polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16: 9909-9916.
- ARNOLD, E., A. JACOBO-MOLINA, R. G. NANNI, R. L. WILLIAMS, X. LU, J. DING, A. D. CLARK JR, A. ZHANG, A. L. FERRIS, P. CLARK, A. HIZI et S. H. HUGHES. 1992. Structure of HIV-1 reverse transcriptase/DNA complex at 7 Å resolution showing active site locations. *Nature* 357: 85-89.
- ARNOLD, E. et G. F. ARNOLD. 1991. «Human immunodeficiency virus structure: implications for antiviral design». dans K. Maramorosch, F. A. Murphy et A. J. Shatkin (éds): *Advances in virus research*, vol. 39. Academic Press Inc., San Diego, Californie. 1-87.
- BACH, M. C. 1989. Failure of zidovudine to maintain remission in patients with AIDS. *N. Engl. J. Med.* 320: 594-595.
- BARRÉ-SINOUSSE, F., J. C. CHERMANN, F. REY, M. T. NUGEYRE, S. CHAMARET, J. GRUEST, C. DAUGUET, C. AXLER-BLIN, F. VÉZINET-BRUN, C. ROUZIOUX, W. ROZENBAUM et L. MONTAGNIER. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-870.
- BOUCHER, C. A. B., E. O'SULLIVAN, J. W. MULDER, C. RAMAUTARSING, P. KELLAM, G. DARBY, J. M. A. LANGE, J. GOUDSMIT et B. A. LARDER. 1992. Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. *J. Infect. Dis.* 165: 105-110.
- BOUCHER, C. A. B., M. TERSMETTE, J. M. A. LANGE, P. KELLAM, R. E. Y DE GOEDE, J. W. MULDER, G. DARBY, J. GOUDSMIT et B. A. LARDER. 1990. Zidovudine sensitivity of human immunodeficiency viruses from high-risk, symptom-free individuals during therapy. *Lancet* 336: 585-590.
- BOYER, P. L., A. L. FERRIS et S. H. HUGHES. 1992a. Cassette mutagenesis of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 66: 1031-1039.
- BOYER, P. L., A. L. FERRIS et S. H. HUGHES. 1992b. Mutational analysis of the fingers domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Virol.* 66: 7533-7537.
- CANN, A. J. et J. KARN. 1989. Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle. *AIDS* 3: 519-534.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1992. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 41 (RR-17): 1-19.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1990. Public health service statement on management of occupational exposure to human immunodeficiency virus, including considerations regarding zidovudine postexposure use. *MMWR* 39 (RR-1): 1-14.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1982. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - United States. *MMWR* 31: 507-514.

CLARK, J. M. 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 16: 9677-9686.

COFFIN, J. M. 1990. «Retroviridae and their replication». dans B. N. Fields et D. M. Knipe (éds): *Virology*, vol. 2, 2^e éd. Raven Press, New York, NY. 1437-1500.

COFFIN, J., A. HAASE, J. A. LEVY, L. MONTAGNIER, S. OROSZLAN, N. TEICH, H. TEMIN, K. TOYOSHIMA, H. VARMUS, P. VOGT et R. WEISS. 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* 232: 697.

COHEN, E. A., E. F. TERWILLIGER, Y. JALINOOS, J. PROULX, J. G. SODROSKI et W. A. HASELTINE. 1990a. Identification of HIV-1 *vpr* product and function. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 3: 11-18.

COHEN, E. A., G. DEHNI, J. G. SODROSKI et W. A. HASELTINE. 1990b. Human immunodeficiency virus *vpr* product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* 64: 3097-3099.

CONNOLLY, K. J. et S. M. HAMMER. 1992. Antiretroviral therapy: reverse transcriptase inhibition. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 245-254.

CULLEN, B. R. et W. C. GREENE. 1990. Functions of the auxiliary gene products of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 178: 1-5.

DOURNON, E., W. ROZENBAUM, C. MICHON, C. PERRONE, P. DETRUCHIS, E. BOUVET, M. LEVACHER, S. MATHERON, S. GHARAKHANIAN, P. M. GIRARD, S. SALMON, C. LEPORT, M. C. DAZZA, B. REGNIER et THE CLAUDE BERNARD HOSPITAL AZT STUDY GROUP. 1988. Effects of zidovudine in 365 consecutive patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* 2: 1297-1302.

FAN, L. et K. PEDEN. 1992. Cell-free transmission of *vif* mutants of HIV-1. *Virology* 190: 19-29.

FISCHL, M. A., D. D. RICHMAN, M. H. GRIECO, M. S. GOTTLIEB, P. A. VOLBERDING, O. L. LASKIN, J. M. LEEDOM, J. E. GROOPMAN, D. MILDVAN, R. T. SCHOOLEY, G. G. JACKSON, D. T. DURACK, D. PHIL, D. KING et THE AZT COLLABORATIVE WORKING GROUP. 1987. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.* 317: 185-191.

FISHER, A. G., L. RATNER, H. MITSUYA, L. M. MARSELLE, M. F. HARPER, S. BRODER, R. C. GALLO et F. WONG-STAAAL. 1986. Infectious mutants of HTLV-III with changes in the 3' region and markedly reduced cytopathic effects. *Science* 233: 655-659.

FOLKS, T., D. M. POWELL, M. M. LIGHTFOOTE, S. BENN, M. A. MARTIN et A. S. FAUCI. 1986. Induction of HTLV-III/LAV from a nonvirus-producing T-cell line: implications for latency. *Science* 231: 600-602.

FRANKI, R. I. B., C. M. FAUQUET, D. L. KNUDSON et F. BROWN. 1991. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. supplément 2*: 1-450.

FURMAN, P. A., J. A. FYFE, M. H. ST. CLAIR, K. WEINHOLD, J. L. RIDEOUT, G. A. FREEMAN, S. N. LEHRMAN, D. P. BOLOGNESI, S. BRODER, H. MITSUYA et D. W. BARRY. 1986. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83: 8333-8337.

GALLO, R. C., S. Z. SALAHUDDEN, M. POPOVIC, A. M. SHEARER, M. KAPLAN, B. F. HAYNES, T. J. PALKER, R. REDFIELD, J. OLESKA, B. SAFAI, G. WHITE, P. FOSTER et P. A. MARKHAM. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and risk for AIDS. *Science* 224: 500-503.

GAO, Q., Z. GU, M. A. PARNIAK, X. LI et M. A. WAINBERG. 1992. *In vitro* selection of variants of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxyinosine. *J. Virol.* 66: 12-19.

GELDERBLUM, H. R., M. OZEL et G. PAULI. 1989. Morphogenesis and morphology of HIV structure-function relations. *Arch. Virol.* 106: 1-13.

GOTTLIEB, M. S., R. SCHROFF, H. M. SCHANKER, J. D. WEISMAN, P. THIM FAN, R. A. WOLF et A. SAXON. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. *N. Engl. J. Med.* 305: 1425-1431.

GUY, B., M. GEIST, K. DOTT, D. SPEHNER, M.-P. KIENY et J.-P. LECOCQ. 1991. A specific inhibitor of cysteine proteases impairs a *vif*-dependent modification of human immunodeficiency virus type 1 *env* protein. *J. Virol.* 65: 1325-1331.

- HADZOPOULOU-CLADARAS, M., B. K. FELBER, C. CLADARAS, A. ATHANASSOPOULOS, A. TSE et G. N. PAVLAKIS. 1989. The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via *cis*-acting sequence in the *env* region. *J. Virol.* 63: 1265-1274.
- HAMMES, S. R., E. P. DIXON, M. H. MALIM, B. R. CULLEN et W. C. GREENE. 1989. Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: Evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 9549-9553.
- HIZI, A., S. H. HUGHES et M. SHAHARABANY. 1990. Mutational analysis of the ribonuclease H activity of human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase. *Virology* 175: 575-580.
- JACKS, T, M. D. POWER, F. R. MASIARZ, P. A. LUCIW, P. J. BARR et H. E. VARMUS. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 *gag-pol* expression. *Nature* 331: 280-283.
- JACKS, T., K. TOWNSLEY, H. E. VARMUS et J. MAJORS. 1987. Two efficient ribosomal frameshifting events are required for synthesis of mouse mammary tumor virus *gag*-related polyproteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84: 4298-4302.
- JACKS, T et H. E. VARMUS. 1985. Expression of the Rous sarcoma virus *pol* gene by ribosomal frameshifting. *Science* 230: 1237-1242.
- JACOBO-MOLINA, A. et E. ARNOLD. 1991. HIV reverse transcriptase structure-function relationships. *Biochemistry* 30: 6351-6361.
- JAPOUR, A. J., P. A. CHATIS, H. A. EIGENRAUCH et C. S. CRUMPACKER. 1991. Detection of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates with reduced sensitivity to zidovudine and dideoxyinosine by RNA-RNA hybridization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 88: 3092-3096.
- JOHNSON, M. S., M. A. McCLURE, D.-F. FENG, J. GRAY et F. DOOLITTLE. 1986. Computer analysis of retroviral *pol* genes: assignment of enzymatic functions to specific sequences and homologies with nonviral enzymes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 83: 7648-7652.
- KAMER, G. et P. ARGOS. 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerase from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* 12: 7269-7282.
- KELLAM, P., C. A. B. BOUCHER et B. A. LARDER. 1992. Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89: 1934-1938.

KIM, S., K. IKEUCHI, R. BYRN, J. GROOPMAN et D. BALTIMORE. 1989. Lack of a negative influence on viral growth by the *nef* gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 9544-9548.

KOHLSTAEDT, L. A., J. WANG, J. M. FRIEDMAN, P. A. RICE et T. A. STEITZ. 1992. Crystal structure at 3,5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256: 1783-1790.

LAND, S., G. TRELOAR, D. McPHEE, C. BIRCH, R. DOHERTY, D. COOPER et I. GUST. 1990. Decreased *in vitro* susceptibility to zidovudine of HIV isolates obtained from patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 161: 326-329.

LANGTRY, H. D. et D. M. CAMPOLI-RICHARDS. 1989. Zidovudine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs* 37: 408-450.

LARDER, B. A., K. E. COATES et S. D. KEMP. 1991a. Zidovudine-resistant human immunodeficiency virus selected by passage in cell culture. *J. Virol.* 65: 5232-5236.

LARDER, B. A., P. KELLAM et S. D. KEMP. 1991b. Zidovudine resistance predicted by direct detection of mutations in DNA from HIV-infected lymphocytes. *AIDS* 5: 137-144.

LARDER, B. A. et S. D. KEMP. 1989. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). *Science* 246: 1155-1158.

LARDER, B. A., G. DARBY et D. D. RICHMAN. 1989a. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* 243: 1731-1734.

LARDER, B. A., S. D. KEMP et D. J. M. PURIFOY. 1989b. Infectious potential of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutants with altered inhibitor sensitivity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 4803-4807.

LARDER, B. A., D. J. M. PURIFOY, K. L. POWELL et G. DARBY. 1987. Site-specific mutagenesis of AIDS virus reverse transcriptase. *Nature* 327: 716-717.

LEVY, J. A., A. D. HOFFMAN, S. M. KRAMER, J. A. LANDIS, J. M. SHIMABUKURO et L.S. OSHIRO. 1984. Isolation of lymphocytopathic retrovirus from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225: 840-842.

LINDBORG, B. 1992. Polymerase domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and herpes simplex virus type 1 DNA polymerase: their predicted three-dimensional structure and some putative functions in comparison with *E. coli* DNA polymerase 1. A critical survey. *Antiviral Chem. Chemother.* 3: 223-241.

LUCIW, P. A., C. CHENG-MAYER et J. A. LEVY. 1987. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the *orf-B* region down regulate virus replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**: 1434-1438.

MALIM, M. H., J. HAUBER, S.-Y. LE, J. V. MAIZEL et B. R. CULLEN. 1989. The HIV-1 *rev* *trans*-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**: 254-157.

MARX, P. A., R. J. MUNN et K. I. JOY. 1988. Computer emulation of section electron microscopy predicts an envelope-associated icosadeltahedral capsid for human immunodeficiency virus. *Lab. Invest.* **58**: 112-118.

MASUR, H., M. A. MICHELIN, J. B. GREENE, I. ONORATO, R. A. VANDE STOUWE, R. S. HOLZMAN, G. WORMSER, L. BRETTMAN, M. LANGE, H. W. MURRAY et S. CUNNINGHAM-RUNDLES. 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **305**: 1431-1438.

MEINKOTH, J. et G. WAHL. 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* **138**: 267-284.

MITSUYA, H., R. YARCHOAN, S. KAGEYAMA et S. BRODER. 1991. Targeted therapy of human immunodeficiency virus-related disease. *FASEB J.* **5**: 2369-2381.

MITSUYA, H., K. J. WEINHOLD, P. A. FURMAN, M. H. ST. CLAIR, S. NUSINOFF LEHRMAN, R. C. GALLO, D. BOLOGNESI, D. W. BARRY et S. BRODER. 1985. 3-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7096-7100.

MUNIS, J. R., R. S. KORNBLUTH, J. C. GUATELLI et D. D. RICHMAN. 1992. Ordered appearance of human immunodeficiency virus type 1 nucleic acids following high multiplicity infection of macrophages. *J. Virol.* **73**: 1899-1906.

REDFIELD, R. R. et D. S. BURKE. 1987. Shadow on the land: the epidemiology of HIV infection. *Viral Immunol.* **1**: 69-81.

RESTLE, T., B. MÜLLER et R. S. GOODY. 1990. Dimerization of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J. Biol. Chem.* **265**: 8986-8988.

RICHMAN, D. D. 1992. HIV drug resistance. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**: 1065-1071.

RICHMAN, D. D., M. A. FISCHL, M. H. GRIECO, M. S. GOTTLIEB, P. A. VOLBERDING, O. L. LASKIN, J. M. LEEDOM, J. E. GROOPMAN, D. MILDVAN, M. S. HIRSCH, G. G. JACKSON, D. T. DURACK, D. PHIL, S. NUSINOFF-LEHRMAN et THE AZT COLLABORATIVE WORKING GROUP. 1987. The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A doubled-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.* 317: 192-197.

RIMSKY, L., J. HAUBER, M. DUKOVICH, M. H. MALIM, A. LANGLOIS, B. R. CULLEN et W. C. GREENE. 1988. Functional replacement of the HIV-1 *rev* protein by the HTLV-1 *rex* protein. *Nature* 335: 738-740.

ROBERT-GUROFF, M., M. POPOVIC, S. GARTNER, P. MARKHAM, R. C. GALLO et M. S. REITZ. 1990. Structure and expression of *tat*-, *rev*-, and *nef*-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages. *J. Virol.* 64: 3391-3398.

ROOKE, R., M. TREMBLAY, H. SOUDEYNS, L. DESTEPHANO, X.-J. YAO, M. FANNING, J. S. G. MONTANER, M. O'SHAUGHNESSY, K. GELMON, C. TSOUKAS, J. GILL, J. RUEDY, M. A. WAINBERG et THE CANADIAN ZIDOVUDINE MULTI-CENTRE STUDY GROUP. 1989. Isolation of drug-resistant variants of HIV-1 from patients on long-term zidovudine therapy. *AIDS.* 3: 411-415

ROSEN, C. A., E. TERWILLIGER, A. DAYTON, J. G. SODROSKI et W. A. HASELTINE. 1988. Intragenic *cis*-acting *art* gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85: 2071-2075.

SAKAI, K., X. MA, I. GORDIENKO et D. J. VOLSKY. 1991. Recombinational analysis of a natural noncytopathic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate: role of the *vif* gene in HIV-1 infection kinetics and cytopathicity. *J. Virol.* 65: 5765-5773.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH et T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^e éd. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

SCHWARTZ, S., M. CAMPBELL, G. NASIOULAS, J. HARRISON, B. K. FELBER et G.N. PAVLAKIS. 1992. Mutational inactivation of inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in *rev*-independent *gag* expression. *J. Virol.* 66: 7176-7182.

SCHWARTZ, S., B. K. FELBER, E.-M. FENYÖ ET G. N. PAVLAKIS. 1990. *Env* and *vpu* proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* 64: 5448-5456.

ST. CLAIR, M. H., J. L. MARTIN, G. TUDOR-WILLIAMS, M. C. BACH, C. L. VAVRO, D. M. KING, P. KELLAM, S. D. KEMP et B. A. LARDER. 1991. Resistance to ddI and sensitivity to AZT induced by a mutation in HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 253: 1557-1559.

ST. CLAIR, M. H., C. A. RICHARDS, T. SPECTOR, K. J. WEINHOLD, W. H. MILLER, A. J. LANGLOIS et P. A. FURMAN. 1987. 3'-Azido-3'-deoxythymidine triphosphate as an inhibitor and substrate of purified human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 1972-1977.

STREBEL, K., T. KLIMKAIT, F. MALDARELLI et M. A. MARTIN. 1989. Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 *vpu* protein. *J. Virol.* 63: 3784-3791.

TERWILLIGER, E. F., E. A. COHEN, Y. LU, J. G. SODROSKI et W. A. HASELTINE. 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 *vpu*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 5163-5167.

TREMBLAY, M., R. ROOKE et M. A. WAINBERG. 1992. Zidovudine-resistant and -sensitive HIV-1 isolates from patients on drug therapy: *in vitro* studies evaluating level of replication-competent viruses and cytopathogenicity. *AIDS* 6: 1445-1449.

WILLEY, R. L., F. MALDARELLI, M. A. MARTIN et K. STREBEL. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 *vpu* protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* 66: 226-234.

WILSON, W., M. BRADDOCK, S. E. ADAMS, P. D. RATHJEN, S. M. KINGSMAN et A. J. KINGSMAN. 1988. HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell* 55: 1155-1169.

WONG-STAAAL, F. 1990. «Human immunodeficiency virus and their replication». dans B. N. Fields et D. M. Knipe (éds): *Virology*, vol. 2, 2^e éd. Raven Press, New York, NY. 1529-1542.

YAO, X. J., H. GÖTTLINGER, W. A. HASELTINE et E. A. COHEN. 1992. Envelope glycoprotein and CD4 independence of *vpu*-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J. Virol.* 66: 5119-5126.

YARCHOAN, R., K. J. WEINHOLD, H. K. LYERLY, E. GELMANN, R. M. BLUM, G. M. SHEARER, H. MITSUYA, J. M. COLLINS, C. E. MYERS, R. W. KLECKER, P. D. MARKHAM, D. T. DURACK, S. N. LEHRMAN, D. W. BARRY, M. A. FISCHL, R. C. GALLO, D. P. BOLOGNESI et S. BRODER. 1986. Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex. *Lancet* 1: 575-580.

YU, X., X. YUAN, Z. MATSUDA, T.-H. LEE et M. ESSEX. 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J. Virol.* 66: 4966-4971.

